

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

BIANCA CRUZ PACHANE

**VESÍCULAS EXTRACELULARES: AÇÕES NO
MICROAMBIENTE TUMORAL E POSSÍVEIS
APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

SÃO CARLOS - SP
2024

BIANCA CRUZ PACHANE

**VESÍCULAS EXTRACELULARES: AÇÕES NO MICROAMBIENTE TUMORAL E POSSÍVEIS
APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo

Co-orientadora: Dra. Wanessa Fernanda Altei

São Carlos-SP
2024

Cruz Pachane, Bianca

Vesículas extracelulares: ações no microambiente tumoral e possíveis aplicações terapêuticas / Bianca Cruz Pachane -- 2024.
193f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
Banca Examinadora: Anderson Ferreira da Cunha, Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, Maria Luiza Vilela Oliva, Marcos Roberto Chiaratti, Renato José da Silva Oliveira, Wanessa Fernanda Altei
Bibliografia

1. Vesículas extracelulares. 2. Câncer de mama. 3. Biologia molecular. I. Cruz Pachane, Bianca. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bianca Cruz Pachane, realizada em 26/07/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Sellstre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Wanessa Fernanda Altei (HCB)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva (UNIFESP)

Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira (HCB-PIO XII)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

A todos os mestres que vieram antes, em cujos ombros eu humildemente subo hoje.

AGRADECIMENTOS

Meu doutorado não teria sido possível sem o apoio de uma grande equipe. Minha eterna gratidão a todos os que, direta ou indiretamente, tornaram este sonho em realidade.

Às minhas chefes, Heloísa e Wanessa, que me guiaram durante toda a minha trajetória no LBBM com tanta paciência, agradeço eternamente pelas oportunidades que me permitiram crescer como pessoa e profissional. Sou grata a todos os colegas de LBBM, presentes e passados, que me moldaram durante os últimos oito anos como aluna, tutora, colaboradora e cientista. Um agradecimento especial às pessoas que atuaram diretamente nos resultados descritos nessa tese: Aline, Ana Carol, Bianca Caruso, Larissa, Pedro e Gabriela.

Às agências de fomento, meus profundos agradecimentos pelo financiamento deste projeto, particularmente à FAPESP pelo agraciamento das bolsas de doutorado direto e estágio no exterior, além de CNPq e CAPES pelo apoio à pesquisa.

Aos parceiros acadêmicos que propiciaram a realização desta tese, meus agradecimentos: ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e à Dra. Thais Cataldi (ESALQ/USP), pela condução dos testes de multiômicas; à Prof.^a Dra. Márcia Regina Cominetti e à equipe do LABEN/UFSCar (especialmente à Marina, Arthur, Vanessa, Angelina e Fran) pela parceria e disponibilização de infraestrutura e materiais; à Prof.^a Dra. Cynthia Castro (UFSCar) pelo auxílio com a técnica ELISA; à Dra. Kelli C. Micocci (UFSCar) pelo auxílio com a técnica RT-qPCR; à Prof.^a Dra. Monica Rosas da Costa Iema (UNIARA) pela doação de células; e aos professores que gentilmente cederam suas infraestruturas para realização deste trabalho: Prof. Dr. Otávio Thiemann (IFSC/USP), Prof. Dr. Glaucius Oliva (IFSC/USP), Prof. Dr. Fausto B. R. Almeida (FMRP/USP), Prof.^a Dra. Eneida de Paula (IB/UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Backes (DEMa/UFSCar), Dr. Gerson Rodrigues (DCF/UFSCar), Prof. Dr. Marcelo B. Cioffi (DGE/UFSCar) e Prof. Dr. Ricardo Borra (DGE/UFSCar). pela doação de reagentes e materiais. Agradeço também ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos e INFABIC (UNICAMP) pela parceria científica, e aos colegas de DCF e PPGGEv pelo apoio moral e emocional durante todos esses anos.

A special appreciation to all my colleagues and advisors from the Department of Molecular and Comparative Pathobiology at Johns Hopkins University School of Medicine, particularly Dr. Kenneth W. Witwer and Dr. Olesia Gololobova, for welcoming me during my 12-month stay in Witwer Lab and for allowing me to grow to my full potential. I am forever grateful for your guidance and help throughout my stay in Baltimore and beyond.

Um agradecimento especial à minha família e amigos pela paciência em lidar comigo durante esse doutorado. Obrigada por dividirem comigo o sangue, suor e lágrimas dos últimos cinco anos. Aos meus pais, André e Juliana, sou eternamente grata por todos os sacrifícios que me permitiram chegar até aqui. Às minhas amigas Ana Carol, Aline, Marina, Solange, Jane e Bua, obrigada por me acompanharem nessa loucura que é a vida acadêmica; e aos tenistas da minha vida, Guilherme, Luísa e Thiago, obrigada por me mostrarem um mundo diferente do que eu estou acostumada.

*“Nada na vida é para ser temido, somente compreendido.
Agora é o momento de compreender mais para temer menos.”*

Maria Salomea Skłodowska-Curie

RESUMO

Vesículas extracelulares (EVs) são partículas delimitadas por uma camada bilipídica, secretadas por células para a comunicação intercelular. Em determinadas condições, como no câncer, a liberação de EVs é favorecida e interfere em múltiplas etapas, como na cascata metastática e no microambiente tumoral. O estudo da biologia básica e aplicada de EVs permite a elucidação de novos mecanismos importantes para a saúde humana, sugerindo novos potenciais terapêuticos. Neste trabalho, exploramos a característica adesiva de EVs para aplicações *in vitro*, investigando sua adsorção em superfícies vítrias com microscopia de super-resolução e sugerindo um novo método para utilização de materiais comuns em laboratório para aplicações avançadas. Investigamos as características aprofundadas de EVs de células tumorais de mama por proteômica, observando uma clara diferença na composição proteica entre vesículas hipóxicas e normóxicas. Em estudos celulares, a autossinalização de EVs hipóxicas favoreceu a invasão celular em condições ótimas de oxigênio. Em modelos de co-cultura com células do microambiente tumoral, verificamos que EVs hipóxicas atuam na recapitulação do fenótipo celular, agindo na manutenção da coesão entre células e promoção do microambiente pró-tumoral. Escalonando o estudo para possíveis aplicações terapêuticas, investigamos a internalização de EVs modelo por células B humanas *ex vivo*, corroborando resultados anteriores em modelo de primata e possibilitando maiores avanços nos estudos de farmacocinética e biodistribuição.

Palavras-chave: vesículas extracelulares; câncer de mama; biologia molecular.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are particles delimited by a bilipid layer, secreted by cells for intercellular communication. EV release is favored under certain conditions, such as in cancer, where it interferes in multiple processes including the metastatic cascade and the tumor microenvironment. Studying the basic and applied biology of EVs enables the elucidation of new mechanisms of interest to human health, suggesting new therapeutic potentials. In this work, we explored the adhesive characteristic of EVs for *in vitro* applications, investigating their adsorption on glass surfaces using super-resolution microscopy and proposing a novel method for utilizing common laboratory materials for advanced applications. We investigated the detailed characteristics of EVs from breast cancer cells through proteomics, observing a clear difference in protein composition between hypoxic and normoxic vesicles. In cellular studies, the self-signaling of hypoxic EVs favored cell invasion under optimal oxygen conditions. In co-culture models using cells from the tumor microenvironment, we verified that hypoxic EVs act to recapitulate the cellular phenotype, maintaining cell cohesion in tumor and promoting a pro-tumoral microenvironment. Scaling up the study for potential therapeutic applications, we investigated the internalization of model EVs by human B cells *ex vivo*, corroborating previous findings in primate models and enabling further advancements in pharmacokinetic and biodistribution studies.

Keywords: extracellular vesicles; breast cancer; molecular biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	29
FIGURA 2 – DIVERSIDADE DE TAMANHOS E DENSIDADES DE NANOPARTÍCULAS	31
FIGURA 3 – MAPA DO PLASMÍDEO PLENTI-PALMGRET.....	37
FIGURA 4 – CARACTERIZAÇÃO DE EVS DE CÉLULAS EXPI293F-PALMGRET	45
FIGURA 5 – IMOBILIZAÇÃO DE EVS EM LAMÍNULAS DE VIDRO BOROSSILICATO E DE QUARTZO	47
FIGURA 6 – IMOBILIZAÇÃO DE EVS EM CÂMARAS DE CULTIVO EM LAMÍNULA DE BOROSSILICATO	48
FIGURA 7 – ADESÃO DE CÉLULAS B EM COATING DE EVS	49
FIGURA 8 – CARACTERÍSTICAS DETERMINANTES DO CÂNCER.....	53
FIGURA 9 – SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	54
FIGURA 10 – ISOLAMENTO DE EVS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL	59
FIGURA 11 – CARACTERIZAÇÃO DE EVS DE MDA-MB-231	67
FIGURA 12 – PROTEOMA COMPARATIVO DE SEVH E SEVN.....	68
FIGURA 13 – ESPECTROS DA PADRONIZAÇÃO DA LIPIDÔMICA POR MALDI-TOF/TOF	74
FIGURA 14 – ETAPAS PRINCIPAIS DA CASCATA METASTÁTICA.....	79
FIGURA 15 – IMUNOFENOTIPAGEM DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	91
FIGURA 16 – CONTROLES DO ENSAIO DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	92
FIGURA 17 – INVASÃO CELULAR MEDIADA POR SEVH.....	94
FIGURA 18 – ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DE MDA-MB-231 SOB HIPÓXIA OU SEVH	96
FIGURA 19 – RESPOSTAS HIF-INDEPENDENTES EM CÉLULAS TRATADAS COM SEVH.....	98
FIGURA 20 – PROTEOMA COMPARATIVO DE MDA-MB-231	99
FIGURA 21 - RESUMO DA AUTOSSINALIZAÇÃO DE SEVH EM MDA-MB-213	105
FIGURA 22 – COMPOSIÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL	107
FIGURA 23 - DESENHO EXPERIMENTAL DA CO-CULTURA DIRETA	112
FIGURA 24 – INVASÃO EM GELATINA EM CO-CULTIVO INDIRETO	114
FIGURA 25 – SISTEMA QUASI-VIVO.....	115
FIGURA 26 – CO-CULTURA MULTICELULAR SOB FLUXO (MC ₃).....	117
FIGURA 27 – EFEITOS DE EVH NA DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS E NA MOTILIDADE CELULAR	119
FIGURA 28 – MODULAÇÃO DA INVASÃO CELULAR EM GELATINA POR EVH.....	121
FIGURA 29 – CO-CULTURA DIRETA ENTRE CÉLULAS DO MICROAMBIENTE TUMORAL.....	122
FIGURA 30 – CO-CULTURA INDIRETA EM CÂMARA DE BOYDEN DE CÉLULAS DO TME.....	124
FIGURA 31 – PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO CELULAR SOB FLUXO	126
FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DA CO-CULTURA MULTICELULAR CIRCULANTE	128
FIGURA 33 – MECANISMOS DE INTERNALIZAÇÃO DE EVS	135

FIGURA 34 – RESUMO GRÁFICO DOS ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE EVs COM SANGUE <i>EX VIVO</i> ..	138
FIGURA 35 – SEPARAÇÃO DE PBMCs POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	140
FIGURA 36 – IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS CD45+ EM <i>CHIPS</i> PARA <i>DSTORM</i>	142
FIGURA 37 – ASSOCIAÇÃO DE EVs COM LINFÓCITOS B DE NHP.....	145
FIGURA 38 – INTERNALIZAÇÃO DE EVs MEDIADA POR CLATRINA.....	147
FIGURA 39 – ASSOCIAÇÃO DE EVs COM LINFÓCITOS B HUMANOS.....	148
FIGURA 40 – FRACIONAMENTO DE LINFÓCITOS B	149

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM <i>WESTERN BLOTTING</i> QUALITATIVO.....	60
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO QUANTITATIVA DE EVS	66
TABELA 3 – DEZ PROTEÍNAS COM MAIOR SCORE EM SEV	69
TABELA 4 – PROTEOMA DIFERENCIALMENTE EXPRESSO EM SEVH ($P<0,01$)	69
TABELA 5 – METABÓLITOS DE SEVH (N=1).....	75
TABELA 6 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS PARA <i>WESTERN BLOTTING</i> QUANTITATIVO	83
TABELA 7 – ESPECIFICAÇÕES DOS <i>PRIMERS</i> SENSO E ANTISENSO PARA RT-QPCR.....	88
TABELA 8 - CONTAGEM DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS POR PROTEÔMICA	100
TABELA 9 – DEZ PROTEÍNAS COM MAIOR SCORE EM MDA-MB-231	100
TABELA 10 – DETALHAMENTO DA CO-CULTURA DIRETA	112
TABELA 11 – ANTICORPOS UTILIZADOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	141

LISTA DE SIGLAS

7AAD	7-aminoactinomicina D (do inglês: <i><u>7-aminoactinomycin D</u></i>)
ACD	anticoagulante ácido cítrico dextrose
ACK	tampão amônio-cloreto-potássio
ADAM	<i><u>a disintegrin and metalloprotease</u></i>
AF4	fracionamento assimétrico sob fluxo (do inglês: <i><u>assymetric flow field-flow fractionation</u></i>).
ALIX	proteína X interativa com o gene relacionado à apoptose 2 (do inglês: <i><u>apoptosis-linked gene 2-interacting protein X</u></i>)
ANOVA	análise de variância (do inglês: <i><u>analysis of variance</u></i>)
Arg-1	<i><u>Arginase-1</u></i>
ATCC	<i><u>American Type Cell Culture</u></i>
ATP	adenosina trifosfato (do inglês: <i><u>adenosine triphosphate</u></i>)
BCA	ácido bicinconínico (do inglês: <i><u>bicinchoninic acid</u></i>)
BRCA	<i><u>breast cancer gene</u></i>
BSA	soroalbumina bovina (do inglês: <i><u>bovine soroalbumine</u></i>)
BV650	<i><u>Brilliant™ Violet 650</u></i>
CAA	adopócito associado ao câncer (do inglês: <i><u>cancer-associated adipocyte</u></i>)
CAF	fibroblasto associado ao câncer (do inglês: <i><u>cancer-associated fibroblast</u></i>)
CANX	calnexina
CAV1	<i><u>caveolina-1</u></i>
CD	<i><u>cluster</u></i> de diferenciação
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês: <i><u>complementary deoxyribonucleic acid</u></i>)
CLTC	cadeia pesada da clatrina
CM	meio condicionado (do inglês: <i><u>conditioned medium</u></i>)
CPD	anticoagulante citrato-fosfato-dextrose (do inglês: <i><u>citrate-phosphate-dextrose</u></i>)
CSF	fator estimulador de colônias (do inglês: <i><u>colony-stimulating factor</u></i>)
Ct	<i><u>cycle threshold</u></i>
Cy5	<i><u>Cyanine-5</u></i>
Cyt	citoplasma (do inglês: <i><u>cytoplasm</u></i>)
D.O.	<i><u>densidade óptica</u></i>
DAPI	<i><u>4',6-diamidino-2-phenylindole</u></i>
DB	base de dados (do inglês: <i><u>database</u></i>)
DG	gradiente de densidade (do inglês: <i><u>density gradient</u></i>)
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico (do inglês: <i><u>2,5-dihydroxybenzoic acid</u></i>)

DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	<i>dimetilsulfóxido</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNAse	desoxirribonuclease (do inglês: <i>deoxyribonuclease</i>)
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados (do inglês: <i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
DPBS	tampão fosfato salino de Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's phosphate buffer saline</i>)
dSTORM	microscopia de reconstrução ótica estocástica direta (do inglês: <i>direct stotastic optical reconstruction microscopy</i>)
DTT	<i>diitioitretol</i>
DUB	enzimas de <i>deubiquitinização</i>
dUC	ultracentrifugação diferencial (do inglês: <i>differential ultracentrifugation</i>)
ECL	quimioluminescência aumentada (do inglês: <i>enhanced chemiluminescence</i>)
ECM	<i>matriz extracelular</i>
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	fator de crescimento epidermal (do inglês: <i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (do inglês: <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
Em	emissão
ER	receptor de estrogênio (do inglês: <i>estrogen receptor</i>)
ESCRT	complexos endossomais de organização necessários para transporte (do inglês: <i>endosomal sorting complexes required for transport</i>)
EV	vesícula extracelular (do inglês: <i>extracellular vesicle</i>)
EVh	vesícula extracelular derivada de hipóxia (do inglês: <i>extracellular vesicle from hypoxia</i>)
EVn	vesícula extracelular derivada de normóxia (do inglês: <i>extracellular vesicle from normoxia</i>)
Exc	excitação
FASTA	<i>Fast-All</i>
FBS	soro fetal bovino (do inglês: <i>fetal bovine serum</i>)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos (do inglês: <i>fibroblast growth factor</i>)
FITC	do inglês: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FLOT	flotilina
FMO	fluorescência menos um (do inglês: <i>fluorescence minus one</i>)

FSC	<i>f</i> orward <i>s</i> catter
G-CSF	fator estimulador de colônias granulocitárias (do inglês: <i>g</i> ranulocyte <i>c</i> olony- <i>s</i> timulating <i>f</i> actor)
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (do inglês: <i>g</i> lycer <u>a</u> ldehyde 3- <i>p</i> hosphate <i>d</i> e <u>h</u> ydrogenase)
GC-MS	cromatografia gasosa - espectrometria de massas (do inglês: <i>g</i> as <i>c</i> hromatography – <i>m</i> ass <i>s</i> pectrometry)
GTP	trifosfato de guanosina (do inglês: <i>g</i> uanosine <i>t</i> riphosphate)
HBSS	solução salina balanceada de Hanks (do inglês: <i>H</i> anks' <i>b</i> alanced <i>s</i> alt <i>s</i> olution)
HD	doador humano (do inglês: <i>h</i> uman <i>d</i> onor)
HDL	lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>h</i> igh <i>d</i> ensity <i>l</i> ipoprotein)
HER2	receptor tipo 2 do fator epidérmico humano (do inglês: <i>h</i> uman <i>e</i> pidermal <i>f</i> actor 2)
HGF	fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: <i>h</i> epatocyte <i>g</i> rowth <i>f</i> actor)
HIF	fator induzível por hipóxia (do inglês: <i>h</i> ypoxia- <i>i</i> nducible <i>f</i> actor)
HPC	célula precursora hematopoiética (do inglês: <i>h</i> ematopoietic <i>p</i> rogenitor <i>c</i> ell)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>h</i> igh- <i>p</i> erformance <i>l</i> iquid <i>c</i> hromatography)
HPRT	hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (do inglês: <i>h</i> ypoxanthine- <i>g</i> uanine <i>p</i> hosphoribosyltransferase)
HRP	peroxidase de rábano (do inglês: <i>h</i> orseradish <i>p</i> eroxidase)
Hyp	hipóxia
IAA	i <u>o</u> do <u>a</u> cet <u>a</u> mida
ID	i <u>de</u> ntific <u>ad</u> or
IF	i <u>mu</u> no <u>fl</u> uorescência
IFN- γ	i <u>nter</u> feron γ
IgD	i <u>mu</u> no <u>g</u> lobulina D
IGF	fator de crescimento insulina-símile (do inglês: <i>i</i> nsulin- <i>l</i> ike <i>g</i> rowth <i>f</i> actor)
IgG	i <u>mu</u> no <u>g</u> lobulina G
IL	i <u>nter</u> leucina
ILV	vesículas intraluminais (do inglês: <i>i</i> ntra <u>l</u> uminal <i>v</i> esicles)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IP	i <u>mu</u> no <u>p</u> recipitação ou i <u>ni</u> bidor de protease
IRF3	Fator regulador de interferon 3 (do inglês: <i>i</i> nterferon <i>r</i> egulatory <i>f</i> actor 3)
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (do inglês: <i>I</i> nternational <i>S</i> ociety for <i>E</i> xtracellular <i>V</i> esicles)
ISG15	gene estimulado pelo interferon 15 (do inglês: <i>i</i> nterferon- <i>s</i> timulated <i>g</i> ene 15)

ITG	integrina
Ki67	antígeno <u>K</u> iel <u>6</u> 7
LC	cromatografia líquida (do inglês: <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês: <i>liquid chromatography - mass spectrometry</i>)
LDL	lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>low density lipoprotein</i>)
LEV	vesículas extracelulares grandes (do inglês: <i>large extracellular vesicles</i>)
LM	microscopia de campo claro (do inglês: <i>light microscopy</i>)
Lys	lisado celular (do inglês: <i>cell lysate</i>)
M-CSF	fator estimulador de colônias em macrófagos (do inglês: <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
M ₀	macrófagos não-polarizados
mAb	anticorpo monoclonal (do inglês: <i>monoclonal antibody</i>)
MACS	coluna de separação magnética (do inglês: <i>magnetic column separation</i>)
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with time of flight</i>
MDSC	células mioderivadas supressoras (do inglês: <i>myeloid-derived suppressor cell</i>)
Mem	<u>m</u> embrana
MEV	vesículas extracelulares médias (do inglês: <i>medium extracellular vesicles</i>)
MEVh	vesícula extracelular média derivada de hipóxia
MEVn	vesícula extracelular média derivada de normóxia
miRNA	<u>m</u> icro <u>R</u> NA
MISEV	<i>Minimal Information for the Study of Extracellular Vesicles</i>
MM	<u>m</u> ei de <u>m</u> ontagem
MMP	metaloproteinase de matriz (do inglês: <i>matrix metalloprotease</i>)
MNC	células mononucleares (do inglês: <i>mononuclear cells</i>)
MS	espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
Ms	rato (do inglês: <i>Mouse</i>)
MSC	célula-tronco mesenquimal (do inglês: <i>mesenchymal stem cell</i>)
MSTFA	N- <u>m</u> etil-trimetil <u>s</u> ilil- <u>t</u> rifluoro <u>a</u> cetamida
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MVB	corpos multivesiculares (do inglês: <i>multivesicular bodies</i>)
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
MZB	células B da zona marginal (do inglês: <i>marginal zone B cells</i>)
n	<u>n</u> úmero amostral
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	fator nuclear kappa de células B ativadas (do inglês: <i>nuclear factor kappa-light-</i>

	<i>chain-enhancer of activated B cells)</i>
NHP	primata não-humano (do inglês: <i>non-human primate</i>)
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NK	<i>natural killer</i>
Nluc	<i>nanoluciferase</i>
NMWL	limite nominal do peso molecular (do inglês: <i>nominal molecular weight limit</i>)
Norm	normóxia
NTA	análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês: <i>nanoparticle tracking analysis</i>)
NTC	controle sem alvo (do inglês: <i>no target control</i>)
PAPS	<i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate</i>
PASEF	<i>Parallel Accumulation–Serial Fragmentation</i>
PBMC	células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	tampão fosfato salino (do inglês: <i>phosphate buffer saline</i>)
PBST	tampão fosfato salino com Tween [®] -20 (do inglês: <i>phosphate buffer saline with Tween[®]-20</i>)
PC	componente principal (do inglês: <i>principal component</i>)
PCA	componente principal de análise (do inglês: <i>principal component of analysis</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês: <i>platelet-derived growth factor</i>)
PDL	poli-D-lisina
PE	ficoeritrina (do inglês: <i>phycoerythrin</i>)
PEG	polietilenoglicol
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
PET	polietileno
PFA	paraformaldeído
PHD	domínio prolil-hidroxilase (do inglês: <i>prolyl hydroxylase domain</i>)
PI	ponto isoelétrico
PIP3	fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (do inglês: <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>)
PLL	poli-L-lisina
PMA	forbol 12-miristato-13-acetato (do inglês: <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PR	receptor de progesterona (do inglês: <i>progesterone receptor</i>)
PVDF	fluoreto de polivinilideno (do inglês: <i>polyvinylidene fluoride</i>)

QV	quasi-vivo
Rb	coelho (do inglês: <i>rabbit</i>)
RGDP	<i>RanBP2-like and GRIP domain-containing protein</i>
RI	índice de retenção (do inglês: <i>retention index</i>)
RIPA	tampão de ensaio de radio-imunoprecipitação (do inglês: <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RLU	unidade de luminescência relativa (do inglês: <i>relative luminescence unit</i>)
RNA	ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	espécies reativas de oxigênio (do inglês: <i>reactive oxygen species</i>)
ROUT	<i>robust regression followed by outlier identification</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPTOR	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês: <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SD	desvio padrão (do inglês: <i>standard deviation</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SE Dymax	<i>super enhanced Dymax</i>
SEC	cromatografia de exclusão de tamanho (do inglês: <i>size exclusion chromatography</i>)
SEV	vesículas extracelulares pequenas (do inglês: <i>small extracellular vesicles</i>)
SEVh	vesículas extracelulares pequenas hipóxicas (do inglês: <i>small extracellular vesicles from hypoxia</i>)
SEVn	vesícula extracelular pequena derivada de normóxia (do inglês: <i>small extracellular vesicles from normoxia</i>)
SMAD	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
SNARE	receptores da proteína associada ao sinaptossoma (do inglês: <i>synaptosomal-associated protein receptor</i>)
SP-IRIS	sensor de imageamento de refletância interferométrica de partículas únicas (do inglês: <i>single particle interferometric reflectance imaging sensor</i>)
SRM	microscopia de super-resolução (do inglês: <i>super-resolution microscopy</i>)
SSC	<i>side scatter</i>
TAD	domínio de transativação (do inglês: <i>transactivation domain</i>)
TAI	inflamação associada ao tumor (do inglês: <i>tumor-associated inflammation</i>)
TAM	macrófago associado ao tumor (do inglês: <i>tumor-associated macrophage</i>)
TBST	tampão Tris salino com Tween [®] -20 (do inglês: <i>Tris buffer saline with Tween[®]</i>)

20)

TEM	microscopia eletrônica de transmissão (do inglês: <i>transmission electron microscopy</i>)
TFF	filtração sob fluxo tangencial (do inglês: <i>tangential flow filtration</i>)
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta (do inglês: <i>transforming growth factor beta</i>)
TIC	contagem total de íons (do inglês: <i>total ion count</i>)
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinases (do inglês: <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
timsTOF	<i>trapped ion mobility spectrometry coupled with time of flight</i>
TIRF	microscopia de fluorescência de reflectância total interna (do inglês: <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>)
Tm	temperatura de <i>melting</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMCS	trimetilclorosilano
TME	microambiente tumoral (do inglês: <i>tumor microenvironment</i>)
TNBC	câncer de mama triplo-negativo (do inglês: <i>triple-negative breast cancer</i>)
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>tumor-necrosis factor alpha</i>)
TOF	<i>time of flight</i>
TSG101	<i>tumor-susceptibility gene 101</i>
UAT	acetato de uranila com tilose (do inglês: <i>uranyl acetate with tylose</i>)
UC-FBS	soro fetal bovino ultracentrifugado (do inglês: <i>ultra-centrifuged fetal bovine serum</i>)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VE	vascular <i>endotelial</i>
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	receptor do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
WNT	<i>wingless-related integration site</i>
WT	<i>wild type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
°C	graus Celsius
%	porcentagem
A	ampere
A.U.	unidade arbitrária
bit	dígito binário
cm	centrímetro (= 10^{-3} m)
cm ² /V.s	centrímetro quadrado por volt por segundo
eV	elétron-volt
g	grama
Hz	Hertz
K ₀	mobilidade iônica reduzida
kDa	quilo-Dalton (= 10^3 Da)
kPa	quilopascal (= 10^3 Pa)
kV	quilovolts (= 10^3 V)
L	litro
m	metro
M	molar
mA	mili-ampere (= 10^{-3} A)
mg	miligrama (= 10^{-3} g)
min	minuto
ml	mililitro (= 10^{-3} L)
mm	milímetro (= 10^{-4} m)
mM	milimolar (= 10^{-3} M)
ms	milissegundo (= 10^{-3} s)
mz	razão massa/carga
ng	nanograma (= 10^{-9} g)
nl	nanolitro (= 10^{-9} L)
nm	nanômetro (= 10^{-9} m)
nM	nanomolar (= 10^{-9} M)
ρ	probabilidade estatística
pb	pares de base
pH	potencial de hidrogênio
px	pixel
R ²	coeficiente de determinação
rpm	rotações por minuto
Th	Thomson (= 10^3 quilocalorias)
v	versão
V	volt
v/v	volume por volume
w/v	massa por volume
x g	força gravitacional
µg	micrograma (= 10^{-6} g)
µl	microlitro (= 10^{-6} L)
µm	micrômetro (= 10^{-6} m)
µM	micromolar (= 10^{-6} M)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	26
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO ÀS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	27
1.1 HISTÓRICO	27
1.2 DEFINIÇÃO E BIOGÊNESE	28
1.3 NOMENCLATURA E CARACTERÍSTICAS.....	30
1.4 TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EV	32
1.5 EVS E CÂNCER: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO	33
1.6 CONCLUSÃO	34
CAPÍTULO 2 – ADSORÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM VIDRO PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.2 OBJETIVO	36
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.3.1 Cultivo e Transfecção de Expi293F-palmGRET para Separação de EVs	37
2.3.2 Western Blotting	38
2.3.3 Quantificação Proteica	39
2.3.3.1 Método BCA	39
2.3.3.2 Método microBCA.....	39
2.3.4 Nanocitometria de Fluxo	40
2.3.5 Detecção de Imagens de Refletância Interferométrica de Partícula Única – SP- IRIS.....	40
2.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM	41
2.3.7 Preparação de Câmara de Cultura em Lamínula para Imobilização de EVs	41
2.3.8 Preparação de Lamínulas para Imobilização de EVs.....	41
2.3.9 Microscopia de Reconstrução Ótica Estocástica Direta – dSTORM.....	42
2.3.10 Isolamento de Células B	42
2.3.11 Adesão de Células B em Coating de EV	43
2.3.12 Análise Estatística	44
2.4 RESULTADOS.....	45
2.4.1 Caracterização de EVs de Expi293F-palmGRET	45
2.4.2 Eficácia da Imobilização de EVs em Vidro.....	46
2.4.3 Uniformidade da Imobilização de EVs com PLL	46
2.4.4 Interação de Células B com EVs Imobilizadas em Vidro.....	48
2.5 DISCUSSÃO.....	50

2.6 CONCLUSÃO	51
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES HIPÓXICAS DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVAS.....	52
3.1 INTRODUÇÃO	52
3.1.1 Câncer: Definições e Características	52
3.1.2 Introdução ao Câncer de Mama.....	53
3.1.3 Papel das EVs no Câncer de Mama	55
3.2 OBJETIVOS	56
3.2.1 Objetivos Específicos.....	56
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.3.1 Cultivo Celular	57
3.3.1.1 Ensaio de Detecção de <i>Mycoplasma</i> por Hoechst 33258	57
3.3.2 Separação de Vesículas Extracelulares	58
3.3.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas – NTA.....	59
3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM	59
3.3.5 Western Blotting Qualitativo.....	60
3.3.6 Proteômica.....	61
3.3.6.1 Extração de Proteínas.....	61
3.3.6.2 Proteômica <i>Label Free</i> por LC-MS	61
3.3.6.3 Processamento de Dados e Bioinformática	62
3.3.7 Lipidômica	63
3.3.8 Metabolômica	63
3.3.8.1 Extração de Metabólitos.....	63
3.3.8.2 Teste de Metabolômica por GC-MS	64
3.3.8.3 Processamento de Dados	64
3.3.9 Análise Estatística	65
3.4 RESULTADOS.....	66
3.4.1 Caracterização de EVh e EVn de MDA-MB-231	66
3.4.2 Proteoma Comparativo de SEVh e SEVn	67
3.4.3 Padronização para Análise Lipidômica de EVs.....	74
3.4.4 Padronização para Análise Metabolômica de EVs.....	74
3.5 DISCUSSÃO	76
3.6 CONCLUSÃO	77
CAPÍTULO 4 – INVASÃO TUMORAL MEDIADA POR VESÍCULAS EXTRACELULARES HIPÓXICAS NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO	78
4.1 INTRODUÇÃO	78
4.2.1 Microambiente Tumoral	78

4.2.2 Cascata Metastática	79
4.2 OBJETIVOS.....	81
4.2.1 Objetivos específicos	81
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	82
4.3.1 Desenho Experimental	82
4.3.2 Western Blotting Quantitativo	82
4.3.3 Ensaio de Invasão Celular <i>in vitro</i>	83
4.3.3.1 Invasão em Câmara de Boyden com Matrigel	83
4.3.3.2 Ensaio de Degradação de Gelatina Fluorescente.....	84
4.3.4 Zimografia em Gelatina	85
4.3.5 Expressão Gênica por RT-qPCR	86
4.3.5.1 Extração de RNA Total	86
4.3.5.2 Transcrição Reversa.....	87
4.3.5.3 Padronização dos primers.....	87
4.3.5.4 RT-qPCR.....	88
4.3.6 Avaliação da Morfologia Celular	89
4.3.7 Imunofenotipagem de Integrinas por Citometria de Fluxo	90
4.3.8 Ensaio de Apoptose por Citometria de Fluxo	91
4.3.9 Análise estatística	92
4.4 RESULTADOS.....	93
4.4.1 Indução da Invasão de MDA-MB-231 por SEVh	93
4.4.2 Promoção do Fenótipo Migratório de MDA-MB-231 em Normóxia por SEVh	95
4.4.3 Alteração no Perfil de Integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ em Hipóxia	95
4.4.5 Apoptose Mediada por Hipóxia é Modulada por SEVh em TNBC	97
4.4.6 Proteoma Comparativo de MDA-MB-231	98
4.5 DISCUSSÃO.....	102
4.6 CONCLUSÃO	105
CAPÍTULO 5 – ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA TRIPLO- NEGATIVO POR CO-CULTURA MULTICELULAR CIRCULANTE	106
5.1 INTRODUÇÃO.....	106
5.2 OBJETIVOS.....	108
5.2.1 Objetivos Específicos	108
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	109
5.3.1 Cultivo Celular	109
5.3.1.1 Detecção de <i>Mycoplasma</i> por Luciferase	109
5.3.2 Diferenciação de Monócitos em Macrófagos	110
5.3.3 Motilidade Celular por Microscopia em Tempo Real	110
5.3.4 Invasão Celular em Matriz de Gelatina	111

5.3.5 Viabilidade Celular por Resazurina.....	111
5.3.6 Co-Cultivo Direto em Matriz de Gelatina	112
5.3.7 Co-Cultura Indireta em Câmara de Boyden	113
5.3.8 Cultivo sob Fluxo – <i>Quasi-Vivo</i>	114
5.3.8.1 Preparo de Lamínulas com Matrizes Exógenas.....	114
5.3.8.2 Montagem do Sistema <i>Quasi-Vivo</i>	115
5.3.8.3 Controles Individuais da Co-Cultura sob Fluxo	115
5.3.8.4 Co-Cultura Multicelular sob Fluxo (MC ₃).....	116
5.3.9 Imunofluorescência - IF.....	117
5.3.10 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima - ELISA	118
5.3.10 Análise estatística.....	118
5.4 RESULTADOS.....	119
5.4.1 Influência de EVh em Células do Microambiente Tumoral	119
5.4.2 Efeito de EVh na Co-Cultura Direta entre Células do Microambiente Tumoral .	120
5.4.3 Ação de EVh na Invasão Celular Tumoral em Co-Cultura Indireta	123
5.4.4 Co-Cultura Sob Fluxo Como Modelo de Estudo do Microambiente Tumoral....	125
5.5 DISCUSSÃO.....	129
5.6 CONCLUSÃO	133
CAPÍTULO 6 – ASSOCIAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE VESÍCULAS	
EXTRACELULARES POR CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	134
6.1 INTRODUÇÃO.....	134
6.2 OBJETIVOS.....	136
6.2.1 Objetivos Específicos.....	136
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS	137
6.3.1 Obtenção de Sangue Total de Primatas e Humanos	137
6.3.2 Administração de EVs em Sangue <i>Ex Vivo</i>	137
6.3.3 Isolamento de Células Periféricas Mononucleares Sanguíneas (PBMC)	138
6.3.4 Seleção Positiva de Linfócitos B CD20 ⁺	139
6.3.5 Extinção de Fluorescência com <i>Trypan Blue</i> por Citometria de Fluxo	139
6.3.6 Imunofluorescência e Microscopia Confocal	140
6.3.7 Imobilização de Células CD45 ⁺ em <i>Chip</i>	142
6.3.8 Fracionamento Celular	143
6.3.9 Ensaio de Nanoluciferase	144
6.3.10 Análise Estatística	144
6.4 RESULTADOS.....	145
6.4.1 Associação e Internalização de EVs em Linfócitos B de NHP	145
6.4.2 Internalização de EVs por Mecanismos Dependentes de Clatrina.....	146
6.4.3 Associação de EVs com Linfócitos B Humanos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	146

6.5 DISCUSSÃO.....	151
6.6 CONCLUSÃO	153
ANEXO A – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA A REVISTA <i>JOURNAL OF EXTRACELLULAR BIOLOGY</i>	CLXVIII
ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES</i>.....	CLXXXV
ANEXO C – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA <i>BIOMEDICINES</i>..	CLXXXVI
ANEXO D – PROTEOMA DIFERENCIAL DE MDA-MB-231.....	CLXXXVII

APRESENTAÇÃO DA TESE

O estudo da biologia básica e aplicada de vesículas extracelulares (EVs) vem ganhando interesse da comunidade científica nos últimos vinte anos como estruturas cruciais na comunicação intercelular, afetando uma miríade de doenças como o câncer e gerando potenciais aplicações terapêuticas importantes. Dentro deste contexto, investigações em pequena escala sobre as principais características de tipos específicos de EVs são essenciais para a elucidação de novos conhecimentos aplicáveis à saúde humana. Nesta tese, apresentamos os resultados de projetos desenvolvidos entre 2019 e 2024 pela autora no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UFSCar), com período sanduíche realizado no Witwer Laboratory (Johns Hopkins University School of Medicine), que visaram aprofundar os conhecimentos sobre EVs no câncer de mama e em possíveis aplicações terapêuticas. O conteúdo dessa tese será separado em seis capítulos, a fim de melhor discutir os tópicos abordados.

O primeiro capítulo estabelece os fundamentos teóricos das vesículas extracelulares, fornecendo uma visão geral abrangente de sua biogênese, composição e funções biológicas como base para compreensão dos próximos capítulos. No segundo capítulo, investigamos a adsorção de EVs em superfícies vítrias, permitindo seu uso em ensaios celulares. No terceiro capítulo, descrevemos as características de EVs secretadas por células tumorais de mama em condições de hipóxia por meio de técnicas de análise em larga escala, junto de métodos bioquímicos e biomoleculares.

O quarto capítulo demonstra o papel de vesículas extracelulares tumorais hipóxicas na invasão tumoral, sob o contexto do câncer de mama triplo-negativo, e a influência da oxigenação na resposta mediada por vesículas. No quinto capítulo, descrevemos um modelo de estudo do microambiente tumoral *in vitro*, utilizando um sistema de co-cultura em fluxo que permite a avaliação de respostas individualizadas e sistêmicas de quatro linhagens celulares distintas.

Por fim, o sexto capítulo examina como EVs se associam a células do sangue de primatas não-humanos e de doadores humanos *ex vivo*, delineando os mecanismos de internalização celular e suas aplicações clínicas e terapêuticas em potencial.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO ÀS VESÍCULAS EXTRACELULARES

1.1 HISTÓRICO

Supõe-se que todas as células conhecidas sejam capazes de secretar estruturas contidas por membranas, que são chamadas vesículas extracelulares (EV) (Welsh *et al.*, 2024). Essas estruturas foram descritas primariamente como responsáveis pela depuração de resíduos celulares, mas hoje sabe-se de sua função na comunicação entre células distantes em organismos mais complexos (Couch *et al.*, 2021; van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018).

EVs são conhecidas pelo menos desde 1940, quando Chargaff e West identificaram particulados que reduziam drasticamente o tempo de formação de coágulos sanguíneos, e que posteriormente foram denominadas “proteínas tromboplásticas” (Chargaff, 1945; Couch *et al.*, 2021). Em 1967, Wolf processou sangue por centrifugação diferencial, um método no qual o sobrenadante passa por sucessivas etapas de centrifugação, e identificou materiais infinitamente menores que plaquetas denominados de “poeira plaquetária” (Couch *et al.*, 2021; Wolf, 1967). Em seguida, em 1971, o termo “microvesículas” foi criado por Crawford, que descobriu mediante imageamento a natureza lipídica das partículas e seu potencial de carreamento de biomoléculas, como o ATP (Couch *et al.*, 2021; Crawford, 1971).

Neste período de novas descobertas, inúmeros termos foram cunhados para identificar o que eram, em essência, EVs: “vesículas de matriz”, “partículas vírus-símile”, “exosomos”, “corpos apoptóticos”, “micropartículas”, “ectosomos”, “migrassomos”, dentre outros (Couch *et al.*, 2021; Welsh *et al.*, 2024). Termos acessórios, como vesículas intraluminais (ILV) e corpos multivesiculares (MVB), também foram estabelecidos nessa mesma época.

Estudos mais aprofundados sobre a biologia e potencial de EVs começaram a ser realizados a partir da década de 1980, mas o crescente interesse na área ocorreu no final do século XX, com a descoberta de que EVs provenientes de linfócitos B seriam capazes de apresentar antígenos (Couch *et al.*, 2021; Raposo *et al.*, 1996). Em seguida, verificou-se que EVs de células dendríticas têm o potencial de serem vacinas anti-tumorais em modelos murinos (Zitvogel *et al.*, 1998). Desde então, EVs foram descritas em praticamente todos os níveis filogenéticos, por múltiplos

grupos ao redor do mundo, gerando uma grande quantidade de informações complementares e, muitas vezes, divergentes sobre as partículas estudadas (Théry *et al.*, 2018).

Devido a essas dificuldades, em 2011 foi criada a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), uma organização com intuito de unificar o campo e avançar o estudo de EVs globalmente. Uma das missões do ISEV é a regulamentar os estudos de EVs ao redor do mundo, que é feito através da publicação do MISEV – *Minimal Information on the Study of Extracellular Vesicles*, que está atualmente em sua terceira edição (Lötvall *et al.*, 2014; Théry *et al.*, 2018; Welsh *et al.*, 2024). Nele, pesquisadores formam um consenso para estabelecer definições, discutir requerimentos para caracterização, e criar um guia para que as pesquisas envolvendo EVs sejam reproduzíveis e aplicáveis mundialmente. O MISEV2023, publicado recentemente, contou com a participação da autora desta tese no comitê científico (Welsh *et al.*, 2024).

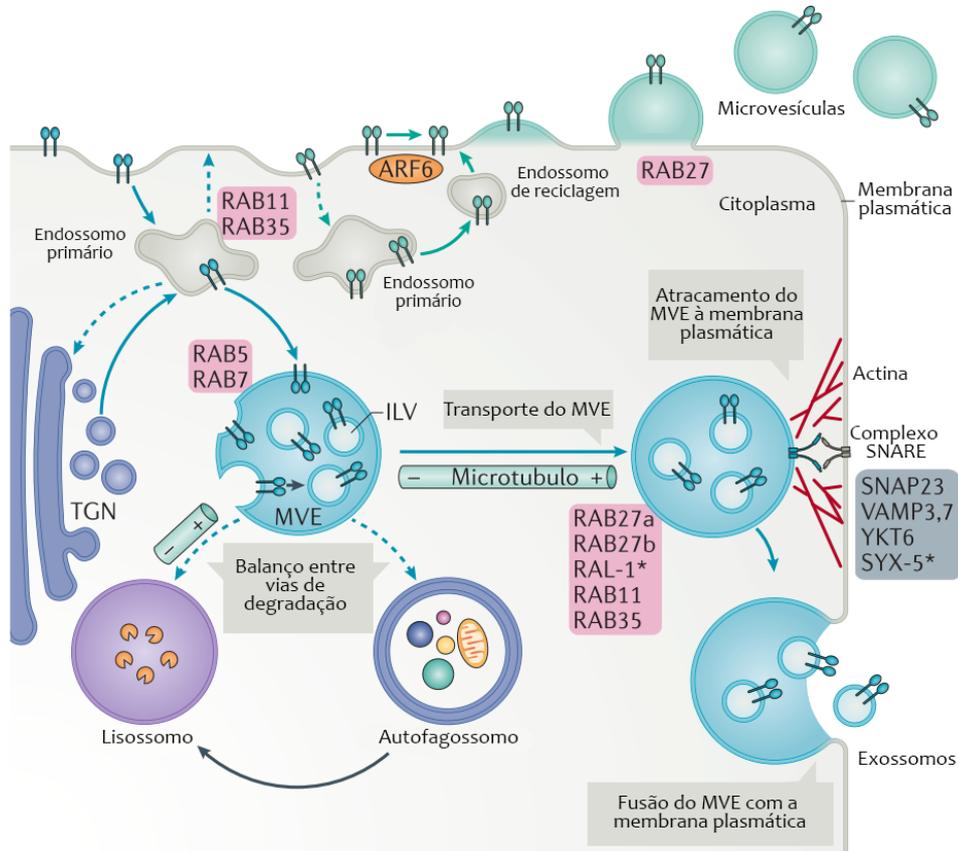
1.2 DEFINIÇÃO E BIOGÊNESE

A definição mais recente de EVs refere-se a partículas secretadas por células que são delimitadas por uma camada bilipídica, e que não conseguem se auto-replicar por não conterem um núcleo funcional (Welsh *et al.*, 2024). EVs são capazes de conter moléculas bioativas dentro de seu lúmen, inseridas na membrana ou associadas à ela, formando uma corona proteica que confere às partículas identidades distintas (Wolf *et al.*, 2022). EVs podem ser formadas por diversas vias de biogênese, cada qual gerando partículas com características únicas que também variam conforme o tipo e as condições das células de origem (van Niel *et al.*, 2022).

A via de biogênese mais conhecida e estudada é a via endossomal. Nela, um endossomo se diferencia em corpos multivesiculares (MVB) ao gerar brotamentos de sua membrana, criando vesículas intraluminais (ILV) que podem ser formadas por mecanismos dependentes ou independentes do complexo ESCRT (complexos endossomais de organização necessários para transporte). O MVB se ancora à membrana plasmática celular através do complexo SNARE (receptores da proteína associada ao sinaptossoma) e se funde à ela, liberando as ILVs ao ambiente extracelular (Figura 1) (van Niel *et al.*, 2022; van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018). A via endossomal geralmente leva à síntese de pequenas vesículas extracelulares (SEV),

com diâmetro entre 50 e 150 nm, que são enriquecidas em marcadores endossomais como ALIX, ESCRT-I/II/III e sintenina (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2022).

Figura 1 – Biogênese de Vesículas Extracelulares



Resumo de vias de biogênese de vesículas extracelulares por brotamento ou por via endossomal.
 FONTE: Van Niel *et al.*, 2018 (traduzido).

Em escala menor, a via endossomal também interfere na biogênese por brotamento de membrana. Neste processo, moléculas que foram organizadas por endossomos de triagem precoces são encaminhadas por endossomos de reciclagem à superfície celular para serem enclausuradas em vesículas (van Niel; D’Angelo; Raposo, 2018). O brotamento é formado pela ativação em conjunto de lipídios, actina e enzimas dependentes de Ca^{2+} , que geram uma assimetria na membrana fosfolipídica e favorecem a formação da vesícula. A biogênese por brotamento leva à vesículas com diâmetro entre 100 e 1.000 nm, enriquecidas com marcadores lipídicos como a fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, e proteicos como actina e anexina (Figura 1) (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel; D’Angelo; Raposo, 2018).

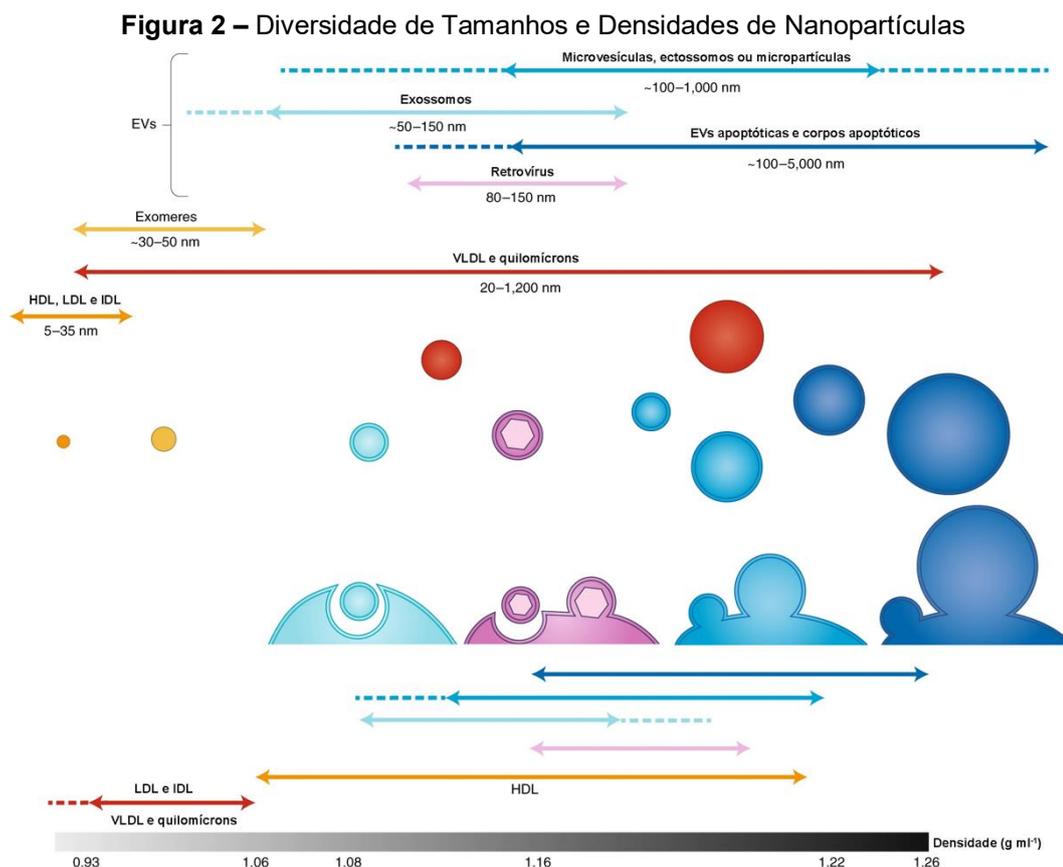
Células também podem secretar vesículas como corpos apoptóticos, derivados do processo de segmentação do corpo celular durante o processo de morte programada. Após estímulo para apoptose, a célula ativa uma cascata proteolítica dependente de caspases, que promove a clivagem de componentes celulares e a degradação por células fagocitárias. Ao final do processo, corpos apoptóticos contendo fragmentos subcelulares não-digeridos de diversos tamanhos (500 nm - 2 µm) são liberados (Battistelli; Falcieri, 2020). A formação de corpos apoptóticos é um processo estocástico que pode também ser formado em uma estrutura de cachos, com pequenas vesículas conectadas entre si por filamentos de membrana (Atkin-Smith *et al.*, 2015). Após a liberação das vesículas, elas podem atuar como sinalizadores intercelulares ou participar de mecanismos de depuração de células imunes (Atkin-Smith *et al.*, 2015).

1.3 NOMENCLATURA E CARACTERÍSTICAS

EVs são descritas na literatura por uma variedade de nomenclaturas, parcialmente devido a convenções pré-estabelecidas nos grupos de pesquisa, por equívocos conceituais ou para a utilização de um termo em voga que potencialize o impacto da publicação. O termo “exossomo” é, talvez, o mais problemático, sendo utilizado de forma indiscriminada por múltiplos autores que não apresentavam comprovação de biogênese por via endossomal, mas considerando-o o decantado resultante de uma ultracentrifugação por 18 horas a 100.000 x g (Kowal *et al.*, 2016). Entretanto, múltiplas partículas podem ser co-precipitadas em preparações submetidas à ultracentrifugação, como no caso de agregados proteicos e microdomínios lipídicos (*lipid rafts*) para meios de cultivo, e HDL e LDL no caso do sangue (Théry *et al.*, 2018). Além disso, diversas subpopulações de EVs apresentam sobreposição de diâmetro, massa e densidade, tornando preparações puras de um tipo específico de EV praticamente impossíveis (Figura 2) (Mathieu *et al.*, 2019; Welsh *et al.*, 2024). A aplicação correta do termo “exossomo” pode ser observada em células vivas, por meio de tecnologias como pHluorin, um marcador sensível à alterações do pH, que permitiu o imageamento de ILVs, MVBs, e a secreção de exossomos associadas ao processo de migração celular (Sung *et al.*, 2020).

A fim de evitar que nomenclaturas específicas sejam usadas sem o devido rigor científico, o MISEV sugere o consenso de que o termo “vesículas extracelulares”

seja aplicado de forma generalizada e, e caso a partícula tivesse alguma característica determinante – como, por exemplo, ser isolada sob condições de hipóxia, esta poderia ser incluída na nomenclatura desde que propriamente descrita no texto (Théry *et al.*, 2018; Welsh *et al.*, 2024). Portanto, nesta tese manteremos a convenção vigente e iremos identificar as amostras como “vesículas extracelulares” ou “EVs”, independente de sua descrição inicial.



Sobreposição dos tamanhos de diferentes tipos de nanopartículas, com mecanismos de biogênese e distintos e densidades similares, demonstram a complexidade do isolamento de populações puras de EVs. FONTE: Mathieu *et al.*, 2019 (traduzido).

Outro ponto fortemente sugerido pelo MISEV é a caracterização de EVs isoladas de preparações biológicas. Sendo EVs partículas nanoscópicas, seu isolamento geralmente envolve decantados de difícil visualização, e torna-se necessário estimar a quantidade de partículas, estabelecer a presença de EVs e averiguar componentes contaminantes à preparação. A caracterização de EVs utiliza-se de diversos métodos generalistas, como *western blotting* e microscopia eletrônica, mas também pode envolver tecnologias mais refinadas como nanocitômetros e

sensores para partículas únicas, ou SP-IRIS. O consenso é que métodos ortogonais e complementares sejam aplicados para determinar as principais características da amostra, visto que a composição e concentração de EVs pode variar a cada preparo (Welsh *et al.*, 2024).

1.4 TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE EV

Preparações de EV podem ser isoladas de amostras biológicas através de meio de cultura condicionado, biofluidos ou tecidos sólidos. Múltiplos métodos foram descritos para tal, incluindo ultracentrifugação diferencial (dUC), filtração e ultrafiltração, precipitação com PEG (polietilenoglicol), gradiente de densidade (DG), imunoprecipitação (IP), cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e fracionamento assimétrico sob fluxo (AF4). Vale ressaltar que o uso de kits para separação de EVs é desencorajado, visto que o alto rendimento das preparações é frequentemente atrelado ao uso de polímeros generalistas, que interagem com múltiplos componentes da preparação e frequentemente co-precipitam contaminantes (Welsh *et al.*, 2024).

Os métodos escolhidos para separar EVs deve levar em consideração (1) o tipo de material inicial, (2) a especificidade do método, e (3) a eficácia de recuperação da amostra após isolamento (Brennan *et al.*, 2020; Welsh *et al.*, 2024). Certas metodologias de alta recuperação e baixa especificidade, como a precipitação com PEG, não são indicadas para a separação de EVs do sangue pois podem co-precipitar partículas plaquetárias, colesterol e agregados proteicos (Brennan *et al.*, 2020). Da mesma forma, o uso de métodos altamente específicos e com baixa recuperação, como a imunoprecipitação, não é indicado para amostras raras por reduzir as chances de recuperação do preparo (Théry *et al.*, 2018). Atualmente é recomendado que dois ou mais métodos sejam utilizados *in tandem* para propiciar preparações mais limpas (Welsh *et al.*, 2024).

Nesta tese, demonstramos o uso de múltiplos métodos para isolamento de EVs do meio de cultura de duas linhagens celulares: centrifugação, filtração sob fluxo tangencial, ultrafiltração e cromatografia de exclusão por tamanho (ver 2.3.1) e ultracentrifugação diferencial e filtração (ver 3.3.2). As amostras obtidas em ambos os casos foram caracterizadas conforme as normas do MISEV vigentes na época de experimentação.

1.5 EVS E CÂNCER: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO

A pesquisa sobre EVs no contexto do câncer foi iniciada com a investigação de neoplasias causadas por vírus na década de 1970 (Couch *et al.*, 2021). Desde então, o entendimento sobre a biologia básica das EVs associou essas partículas a todas as etapas do desenvolvimento e progressão tumoral, sugerindo sua utilização como alvos diagnósticos, prognósticos e terapêuticos (Xu *et al.*, 2018).

A complexidade do tecido tumoral provém principalmente de mecanismos de adaptação ao estresse, que utilizam a maquinaria de biogênese de EVs como tentativa de enfrentamento às condições adversas (Kucharzewska; Belting, 2013). A liberação de EVs no câncer é aumentada em relação ao tecido saudável e pode ser influenciada por fatores como ativação celular, alterações de pH, hipóxia, irradiação, lesões, exposição à proteínas do sistema complemento e estresse celular, gerando diferenças em sua composição biomolecular (Xu *et al.*, 2018). Dessa forma, EVs apresentam papel crucial em processos característicos do câncer, como respostas inflamatórias, angiogênese, linfogênese, transição epitélio-mesenquimal, metástase, supressão do sistema imune, migração, invasão e proliferação celular (Xu *et al.*, 2018).

Devido a essas características, a carga biomolecular de EVs passou a ser investigada para determinação de biomarcadores em potencial (Santiago-Dieppa *et al.*, 2014). Em teoria, um bom biomarcador deve ser específico para um único tipo de tumor e deve ser detectável universalmente em estágios pré-metastáticos, utilizando técnicas minimamente invasivas (Xu *et al.*, 2018). Na realidade, painéis de biomarcadores vêm se tornando mais eficientes que biomarcadores únicos por englobarem múltiplas categorias de biomoléculas, de proteínas a miRNA, aumentando a eficácia do diagnóstico (Lin *et al.*, 2022). A detecção clínica desses painéis é frequentemente associada à biópsias líquidas, que permitem o monitoramento de pacientes antes e durante o tratamento através de amostras de biofluidos como sangue, urina e saliva (Xu *et al.*, 2018).

Além do grande potencial diagnóstico, EVs podem ter também uso terapêutico. Sua composição similar à célula de origem confere às EVs baixa imunogenicidade, o que reduz respostas imunológicas como anafiláxe, liberação de citocinas, neutralização de atividade biológica, reação cruzada com componentes proteicos e reações imunes tardias (Kim *et al.*, 2024). Além disso, a modificação de

células para expressão de marcadores de interesse geralmente promove a transferência desse componente para EVs, criando uma via estável de transferência de biomoléculas entre diferentes compartimentos. Essa abordagem é bastante explorada atualmente para transporte RNAs e proteínas para uma célula alvo ou para favorecer a internalização de EVs mediante modificação de componentes de membrana (Herrmann; Wood; Fuhrmann, 2021). Ambos os potenciais terapêuticos e diagnósticos de EVs são refletidos na área oncológica, em estudos especializados atualmente em andamento ao redor do mundo. Em acesso em 15/08/2024 na plataforma *ClinicalTrials.gov*, 229 estudos clínicos sobre EVs foram encontrados, dos quais 48 têm câncer como foco de estudo e, dentre eles, 7 estão em fases I-III.

1.6 CONCLUSÃO

O avanço no estudo de vesículas extracelulares permite que novas abordagens investigativas de doenças importantes para a saúde humana, como o câncer, sejam desenvolvidas. Ao compreendermos mais sobre as funções correlatas à EVs, como a comunicação intercelular e a regulação do microambiente, é possível que novos alvos sejam detectados com potencial terapêutico bem como biomarcadores diagnósticos.

CAPÍTULO 2 – ADSORÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM VIDRO PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS

2.1 INTRODUÇÃO

EVs são partículas especialmente adesivas devido a sua carga geralmente negativa e presença de moléculas adesivas, como integrinas, que aumentam sua afinidade molecular (Jimenez *et al.*, 2019). Múltiplos estudos investigaram mecanismos específicos de adesão de EVs a materiais, geralmente na tentativa de reduzir sua perda durante a estocagem e/ou manipulação, visto que EVs costumam aderir-se até em plásticos de baixa adesão (Evtushenko *et al.*, 2020; Ge *et al.*, 2014; Görgens *et al.*, 2022). Entretanto, a imobilização direta de EVs em materiais como o vidro pode permitir o avanço de técnicas como a microscopia de fluorescência, e propiciar sua aplicação em ensaios biomoleculares como a inibição da adesão em *coating* de EV (Altei *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, EVs são capturadas para imageamento utilizando reagentes de afinidade molecular, como anticorpos específicos para biomarcadores vesiculares (Reynolds *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2023). Alguns novos *kits* disponíveis comercialmente também permitem a imobilização de EVs em *chips*, permitindo sua caracterização por técnicas como SP-IRIS e microscopia de super-resolução (SRM) (Daaboul *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020). Frequentemente utilizados em preparações celulares, lâminas e lamínulas de vidro podem também ser recobertas com poli-L-lisina (PLL) ou poli-D-lisina (PDL), aminoácidos poliméricos com carga catiônica que aumentam a captura de partículas negativamente carregadas (Altei *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2022).

A imobilização não-específica de EVs pode ser especialmente valiosa para microscopia de fluorescência, visto que a técnica de SRM evoluiu para permitir a caracterização semi-quantitativa multiplex de moléculas únicas em EVs isoladas, o que permite maior enriquecimento de detalhes sobre a heterogeneidade de EVs (Schürz *et al.*, 2022). Por essa razão, investigamos diversos aspectos da imobilização de EVs em superfícies vítrias para imageamento, testando sua aderência direta em lamínulas de vidro borossilicato e quartzo e, adicionalmente, verificando se o pré-recobrimento da superfície com PLL aumenta a imobilização de EVs. Também

examinamos as condições de meios de montagem para imageamento em SRM, a fim de determinar se EVs imobilizadas no vidro poderiam ser utilizadas em análises de interação celulares.

Para tal, utilizamos uma variedade de EV modelo, derivada de células Expi293F com dupla marcação EGFP-Nluc, determinada pelo plasmídeo pLenti-palmGRET após transfecção baseada em lipídios das células em cultivo (Driedonks *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2020). A expressão de EVs fluorescentes ($\lambda_{Em} = 489 \text{ nm}$, $\lambda_{Exc} = 510 \text{ nm}$) é realizada mediante a N-palmitoilação do peptídeo na membrana interna das EVs, gerando partículas estáveis para experimentos *in vitro* e *in vivo* (Driedonks *et al.*, 2022; Rodriguez *et al.*, 2023). Além disso, a síntese de EVs com fluorescência intrínseca é superior ao uso de marcadores lipofílicos por evitar a formação de micelas e resíduos, o que gera falsos-positivos em ensaios de imagem (Loconte *et al.*, 2023).

O conteúdo descrito neste capítulo foi desenvolvido durante o estágio da autora na Universidade Johns Hopkins School of Medicine e os resultados obtidos foram recentemente submetidos para publicação (Anexo A).

2.2 OBJETIVO

Examinar a interação entre vesículas extracelulares e diferentes superfícies vítreas por meio de microscopia de super-resolução dSTORM.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Cultivo e Transfecção de Expi293F-palmGRET para Separação de EVs

O sistema de expressão Expi293™ (#A14635, Gibco) foi utilizado para produção de EVs modelo. Células Expi293F, alteradas a partir da linhagem mamária HEK293 (0,3 x 10⁶ a 0,5 x 10⁶ células/ml) foram cultivadas em suspensão em meio de expressão Expi293, em frascos Erlenmeyer agitados a 100 rpm na estufa a 37 °C, 8% CO₂. Para transfecção estável, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 3 x 10⁶ células/ml com meio fresco. O reagente *Expifectamine*™ 293 foi diluído em *OptiMEM I Reduced Serum Media* (Gibco) seguindo as instruções do fabricante e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. O plasmídeo pLenti-palmGRET (Figura 3) foi diluído em OptiMEM para conter 1 µg de DNA para cada ml de cultura (Wu *et al.*, 2020). Ambas as diluições em OptiMEM foram combinadas por 15 minutos em temperatura ambiente e adicionadas gentilmente aos frascos em agitação. Após 18-22 horas de incubação a 37 °C, 8% CO₂, adicionamos a mistura dos dois *enhancers* à cultura, que permaneceu em incubação por mais dois dias. No terceiro dia, o meio condicionado foi coletado para separação de EVs (Driedonks *et al.*, 2022).

Figura 3 – Mapa do Plasmídeo pLenti-palmGRET

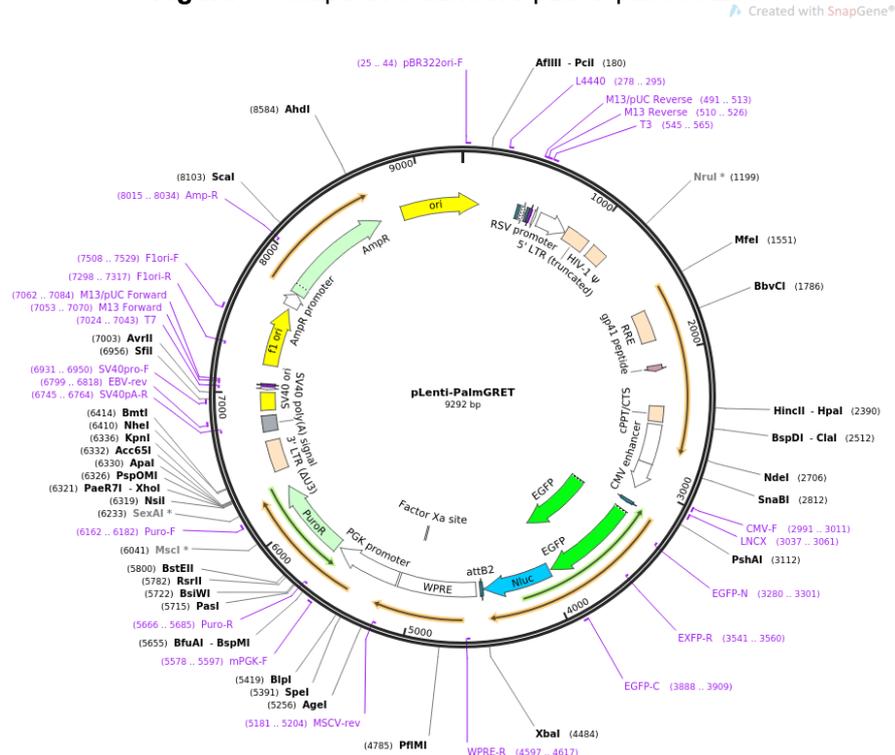


Diagrama comercial do plasmídeo pLenti-palmGRET (WU *et al.*, 2020). FONTE: AddGene.

O meio foi centrifugado a 300 x *g* por 5 minutos para remoção das células suspensas e a 2.000 x *g* por 20 minutos antes de ser filtrado por um sistema com membrana de poros 0,22 µm (Corning). O meio condicionado foi concentrado 10 vezes com dois cassetes de filtração sob fluxo tangencial (*Vivaflow® 50R TFF cassettes*, Sartorius), e concentrado mais 4 vezes por ultrafiltração (*Centricon Plus 70 Ultracel® PL-100*, Merck Millipore) a 4.000 x *g*, 20 minutos, em temperatura ambiente. Após eluição a 1.500 x *g* por 2 minutos, as amostras foram separadas por SEC utilizando colunas qEV10 70nm (iZON) em 12 frações com PBS. As amostras enriquecidas em EVs foram concentradas com filtros *Amicon 15 Ultra RC – 10 kDa MWCO* (Merck Millipore), e estocadas a -80 °C.

2.3.2 Western Blotting

Células Expi293F-palmGRET foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS a 2.500 x *g*, 5 minutos, antes de serem lisadas com tampão RIPA (#9806, Cell Signaling Technology) por 1 hora no gelo, vortexando a cada 15 minutos. O lisado celular foi centrifugado a 14.000 x *g* por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado em novo tubo e quantificado por método BCA (ver 2.3.3.1). Alíquotas das frações da SEC (10 µl) foram lisadas com tampão RIPA por 10 minutos em temperatura ambiente e misturadas com tampão de amostra redutor (#39000, Thermo-Fisher Scientific) ou não-redutor (#39001, Thermo-Fisher Scientific) por 5 minutos a 100 °C. Em seguida, foram aplicadas à géis *Criterion TGX* (4-15% pre-cast, 18 wells; Bio-Rad) junto do padrão proteico *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (#26634, Thermo-Fisher Scientific). A corrida de eletroforese em tampão Tris/glicina/SDS (#1610772, Bio-Rad) foi realizada sob voltagem constante a 100 V por 1,5 horas e a documentação dos géis *stain-free* foi realizada no imageador *Gel Doc EZ imager* (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (*iBlot™ 2 Transfer Stacks*, Invitrogen) no sistema *iBlot™ 2 Gel Transfer Device* (Invitrogen), utilizando o programa: 20 V por 1 minutos; 23 V por 4 minutos; 25 V por 2 minutos. As membranas foram bloqueadas com 5% leite em PBST por pelo menos 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Os anticorpos primários foram diluídos em tampão de bloqueio e incubados por 16-18 horas a 4 °C sob agitação. Para caracterização de EVs, foram utilizados os anticorpos para CD63 (1:3.000, #556016,

BD), CD9 (1:3.000, #312102, BioLegend), sintenina (1:1.000, #133267, Abcam), ALIX (1:1.000, #186429, Abcam) e calnexina (1:1.000, #22595, Abcam). As membranas foram lavadas quatro vezes com 5% leite em PBST por 5 minutos sob agitação e expostas ao anticorpo secundário apropriado (*m-IgGk BP-HRP*, 1:5.000, #616102, Santa Cruz; ou *Mouse anti-Rb IgG HRP*, 1:5.000, #2327, Santa Cruz) por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram lavadas quatro vezes com PBST e expostas por 60 segundos ao substrato *SuperSignal™ West Pico ECL* (Thermo-Fisher Scientific) antes de revelação no equipamento *iBright 1500* (Invitrogen).

2.3.3 Quantificação Proteica

2.3.3.1 Método BCA

Lisados celulares foram quantificados utilizando o *kit BCA™ Protein Assay* (Thermo-Fisher Scientific), mediante comparação a uma curva padrão com concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA, 0 - 2.000 µg). Uma solução contendo ácido bicinconínico (BCA) foi misturada seguindo as instruções do fabricante (50 partes de tampão A para 1 parte de solução de cobre B) e aplicada junto às amostras em uma placa de 96 poços, na proporção 1:1 (v/v). Após incubação por 30 minutos a 37 °C, as placas foram analisadas em espectrofotômetro sob densidade óptica de D.O._{.562 nm} (*SpectraMax iD5*, Molecular Devices). A concentração proteica em µg/ml foi calculada mediante aplicação da equação da reta obtida pela curva padrão, ajustada ao fator de diluição da amostra. Resultados válidos foram considerados se $R^2 \geq 0,990$.

2.3.3.2 Método microBCA

A quantificação proteica de EVs foi realizada com o *kit microBCA™ Protein Assay* (Thermo-Fisher Scientific). Amostras de vesículas foram lisadas em SDS (dodecil sulfato de sódio, 2%) e diluídas em água deionizada na proporção 4:150 (v/v). Em paralelo, mantivemos uma curva padrão de BSA com concentrações variando de 0-16 µg. A solução de BCA foi misturada na proporção de 25 partes de tampão A, 24 partes de intensificador B e 1 parte de solução de cobre C antes de aplicação junto às

amostras em placa de 96 poços (150 µl/poço). Após incubação por 2 h a 37 °C, as placas foram analisadas em espectrofotômetro sob densidade óptica de D.O._{562 nm} (*SpectraMax iD5*, Molecular Devices). A concentração proteica em µg/ml foi calculada mediante aplicação da equação da reta obtida pela curva padrão, ajustada ao fator de diluição da amostra. O resultado foi considerado fidedigno se $R^2 \geq 0.990$.

2.3.4 Nanocitometria de Fluxo

A concentração de partículas, distribuição de tamanho e incidência de EGFP (%) de EVs de Expi293F-palmGRET foi realizada utilizando o Nanocitômetro *NFCM Flow NanoAnalyzer* (NanoFCM Co., Ltd). O sistema foi inicializado pelo alinhamento dos lasers e calibração do equipamento com nanopartículas fluorescentes de sílica de 250 nm (2.19×10^{10} partículas/ml, #QS2503, NanoFCM) para concentração de partículas, e com coquetel de nanoesferas pré-misturadas de sílica com populações de nanopartículas monodispersas com diâmetros de 68 nm, 91 nm, 113 nm e 155 nm (#516M-Exo, NanoFCM). O branco foi realizado com PBS. Amostras de EV foram diluídas 1:1.000 (v/v) em PBS e aspiradas por 60 segundos antes da aquisição do sinal de partículas utilizando pressão constante de 1 kPa e frequência entre 1.500 e 10.000 eventos/minuto. Sinais de *side scattering* e EGFP, concentração de partículas e dispersão de tamanho foram calculados no *software NanoFCM Professional Suite V2.0*.

2.3.5 Detecção de Imagens de Refletância Interferométrica de Partícula Única – SP-IRIS

Chips do *kit* de tetraspaninas humanas (*EV-TETRA-C*, Lote NV221653001D, versão EV-RGT-02, Unchained Labs) foram pré-escaneadas no equipamento *Exoview Analyzer* (Unchained Labs) antes do início do ensaio. EVs de Expi293F-palmGRET (4×10^8 partículas/ml) em 35 µl de solução de incubação foram aplicados ao topo dos chips e mantidos overnight em temperatura ambiente, protegido da luz. Utilizando o lavador de *chips* CD100 e o programa CW-TETRA, os *chips* foram lavados e incubados com anticorpos CD63 e CD81 seguindo as recomendações do fabricante. Os chips foram movidos para rampas com 45° de angulação para drenagem e transferidos para um lenço absorvente para secagem completa. Os chips

foram inseridos no *Exoview Analyzer* para análise de colocalização no *software* do equipamento.

2.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM

EVs (1:20, v/v) foram adsorvidas em *grids* de cobre de malha 400 revestidas com carbono por 2 minutos e o excesso foi removido. Os *grids* foram lavados por flutuação em três gotas de PBS por 1 minuto cada, seguidos de marcação negativa com duas gotas consecutivas de acetato de uranila 1% com tilose (1% UAT em água deionizada, filtrada duplamente em filtro com poro 0,22 µm). Os *grids* foram secos e aspirados rapidamente para cobrir a amostra com uma fina camada de marcador. A visualização das imagens foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi 7600, operando a 80 kV com a câmera AMT XR80 CCD (8 megapixels), sob aumentos de 30.000x a 120.000x.

2.3.7 Preparação de Câmara de Cultura em Lamínula para Imobilização de EVs

Câmaras de cultura em lamínula *Schott D 263*[®] (*µ-Slide 8 Well high Glass Bottom*, #80807, ibidi) foram recobertas com 300 µl de solução de poli-L-lisina (0,1% PLL em H₂O (w/v), Sigma-Aldrich) e incubadas por 16-18 horas a 4 °C. O resíduo de *coating* foi removido por duas lavagens com DPBS (Gibco). EVs de Expi293F-palmGRET (4 x 10⁸ partículas/ml em DPBS, 300 µl por poço) foram utilizadas para recobrir os poços pré-incubados com PLL e poços limpos, sem PLL. As câmaras foram incubadas por 16-18 horas a 4 °C, protegidos da luz. No dia seguinte, os poços foram lavados com DPBS duas vezes (300 µl por poço) e preenchidos com 300 µl de DPBS ou 100 µl de meio de montagem *VECTASHIELD*[®] (Vector Laboratories). Câmaras foram mantidas a 4 °C até o momento da análise. Três repetições independentes com duplicatas técnicas foram realizadas.

2.3.8 Preparação de Lamínulas para Imobilização de EVs

Lamínulas de vidro borossilicato (*Carolina Cover Glasses, Circle 12 mm, Thickness 0.13-0.17 mm*, #NC9537307, Carolina Science & Math) e de quartzo (Ø10mm x 0.25mm thick, #26010, Ted Pella) foram lavadas em etanol 70% e secas

antes do uso. As lamínulas foram incubadas acima de uma gota de 30 µl de diluição de EV (4×10^8 partículas/ml) em *Parafilm M* (Ampcor) *overnight* a 4 °C, protegido da luz. As lamínulas foram lavadas duas vezes com DPBS e montadas em lâminas histológicas utilizando o meio de montagem *VECTASHIELD*[®] (Vector Laboratories). As lâminas foram seladas (*CoverGrip Coverslip Sealant*, #23005, Biotium) e mantidas a 4 °C até o momento da análise. O experimento foi conduzido com duas lamínulas por grupo, em três repetições independentes, utilizando duas preparações de EVs distintas.

2.3.9 Microscopia de Reconstrução Ótica Estocástica Direta – dSTORM

A técnica de dSTORM foi realizada no microscópio de super-resolução *Nanoimager* (ONI), utilizando o software NimOS. A calibração do sistema foi realizada utilizando *beads* detectadas pelos lasers 405/473/532/635 nm com a lente de imersão em óleo de 100x. A calibração do mapeamento do canal foi considerada satisfatória se atingida boa qualidade de cobertura de pontos. As amostras foram avaliadas em três locais randomicamente selecionados (79,28 µm x 49,43 µm), utilizando 2.000 *frames*, 30 ms de exposição e abertura numérica de 1,4. A intensidade de laser foi otimizada para cada amostra. A análise espacial pós-aquisição e estatística foi realizada no *software* CODI (alto.codi.bio), utilizando o aplicativo “*clustering and counting*” para correção de curso, agrupamento de populações, e contagem de partículas. Imagens de campo aberto foram adquiridas em zoom 1x, e imagens reconstituídas foram adquiridas em zoom 6x-8x.

2.3.10 Isolamento de Células B

Amostras de sangue de *Macaca nemestrina* (NHP) foram diluídas em solução salina balanceada de Hank (HBSS, 1:1, v/v) e aplicadas a tubos *SepMate*[™]-15 (IVD) contendo meio de gradiente de densidade *Percoll*[®] (#17-0891-01, Cytiva). Os tubos foram centrifugados a 1.200 x *g* por 10 minutos para separação trifásica do sangue, com as células mononucleares (MNC) na fração superior. As MNCs foram transferidas a tubos novos, lavadas com HBSS e centrifugadas a 300 x *g* por 8 minutos. As células foram tratadas com tampão de lise de hemácias (tampão de lise

ACK, NH₄Cl 0,83%, KHCO₃ 0,1%, EDTA 0,03%) por 10 minutos a 37 °C, lavadas com HBSS e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram ressuspendidas em tampão de seleção gelado (BSA 0,5% e EDTA 2 mM em PBS) e misturadas à CD20 MicroBeads (20%, #130-091-105, Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4 °C. Amostras foram diluídas em tampão de seleção, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos e ressuspendidos em tampão antes da aplicação em colunas MS (#130-042-201, Miltenyi Biotec) para separação magnética utilizando MiniMACS™ (Miltenyi Biotec). Células B foram coletadas em tubos cônicos, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos e cultivados em meio RPMI 1640 10% FBS 1% penicilina/estreptomicina por até dois dias em placas de 6 poços, a 37 °C, 5% CO₂.

2.3.11 Adesão de Células B em Coating de EV

Câmaras de cultura em lamínula (ibidi) foram recobertas com 300 µl de PLL 0,1% por 2 horas a 4 °C, e lavadas com DPBS. Uma suspensão de EVs a 4 x 10⁸ partículas/ml em DPBS foi utilizada para recobrir os poços *overnight* a 4 °C, protegidos da luz. Como controle negativo, utilizamos poços recobertos com BSA-PBS 1%. O excesso de *coating* foi removido por duas lavagens com 300 µl de DPBS, e ligações não-específicas foram bloqueadas com 300 µl de BSA-PBS 1% por 1 hora a 37 °C. Células B (1 x 10⁵ células em 300 µl de meio RPMI 1640 10% FBS, Gibco) foram aplicadas em cada poço e incubadas a 37 °C, 5% CO₂, por 1 hora. Células não aderidas foram removidas com três lavagens de DPBS (300 µl por poço) antes da fixação com paraformaldeído (PFA 4%) por 10 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram lavados duas vezes com DPBS, permeabilizados com Triton X-100 0,1% por 5 minutos, e lavados novamente com DPBS. O citoesqueleto de F-actina foi marcado com *Phalloidin-iFluor 647* (200 µl/poço, diluído 1:1.000 em PBS; #176759, Abcam) por 1 hora no escuro, e o excesso de marcador foi lavado duas vezes com DPBS. Os poços foram recobertos com meio de montagem *Prolong Diamond Antifade* com DAPI (#P36962, Invitrogen) e selados com *Parafilm M* (Amcors) para análise no *Nanolmager* (ONI). Seis imagens de sítios aleatórios foram adquiridas sob aumento de 20x por microscopia confocal, no equipamento *Zeiss 880 Airyscan FAST* (Carl Zeiss). A contagem de células foi realizada por meio de máscara para núcleos, utilizando o programa FIJI (ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012). O experimento foi

conduzido em duas ocasiões independentes, utilizando poços duplicados por grupo em cada repetição.

2.3.12 Análise Estatística

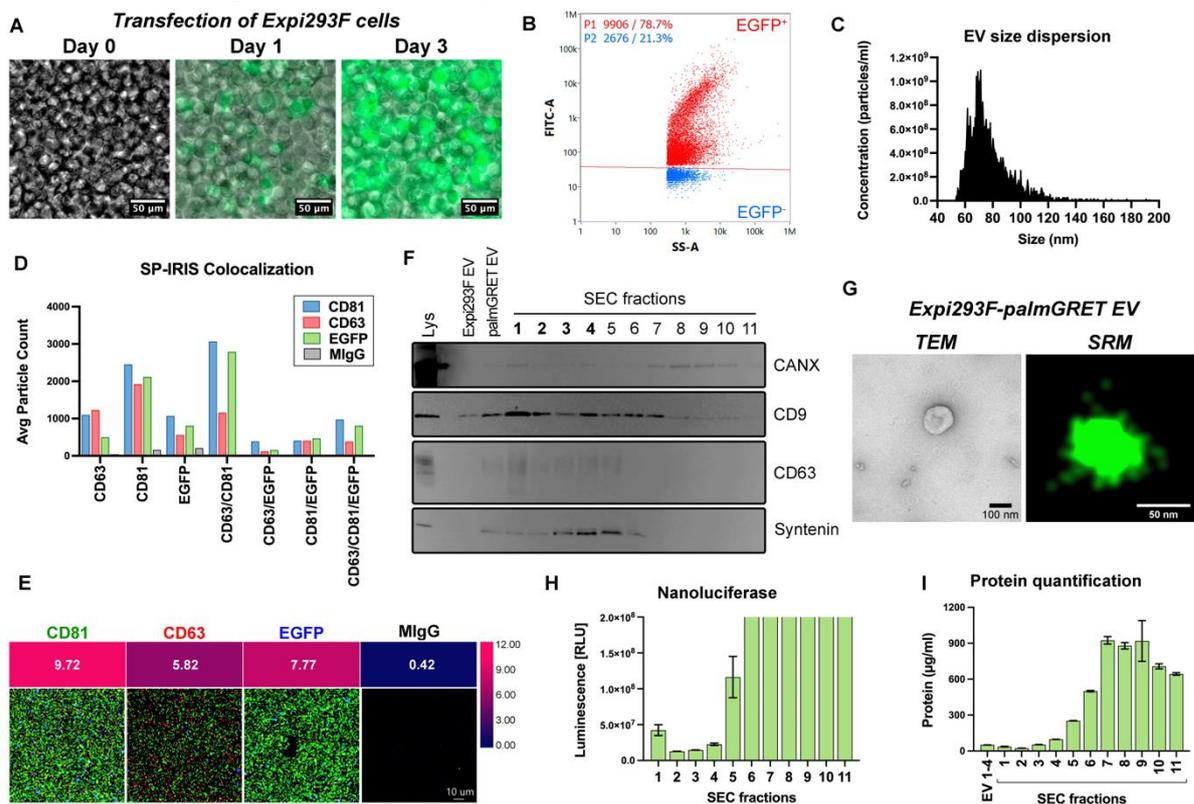
A presença de *outliers* foi verificada utilizando o método ROUT (*robust regression followed by outlier identification*) (Motulsky; Brown, 2006). Foram realizados testes de normalidade de *D'Agostino & Pearson omnibus K2* para determinação da distribuição gaussiana. Dados paramétricos foram analisados por teste t não-pareado ou ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey, e dados não-paramétricos foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. A análise estatística e os gráficos foram executados no programa *GraphPad Prism* (v. 10.0.1 (170)).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização de EVs de Expi293F-palmGRET

Células Expi293F foram cultivadas inicialmente em frascos de 125 ml e, após três subcultivos, foram expandidas para 3 litros de cultura. A transfecção foi realizada em uma suspensão celular com aproximadamente 2.78×10^9 células e, após três dias, essa população atingiu $3,83 \times 10^9$ células no total. A eficiência de transfecção foi determinada por microscopia de fluorescência, sob filtro 488 nm, nos dias 1 e 3 de transfecção (Figura 4A). Após a confirmação da fluorescência em amostras celulares, o meio condicionado foi coletado para separação de EVs.

Figura 4 – Caracterização de EVs de Células Expi293F-palmGRET



A - Transfecção de células Expi293F com pLenti-palmGRET acompanhada por microscopia de fluorescência (barra de escala: 50 μ m). **B** - Intensidade de fluorescência de EVs por análise de nanocitometria de fluxo. **C** - Dispersão do tamanho de partículas obtida por nanocitometria de fluxo; **D** - Co-localização de EVs com CD81 e CD63 por SP-IRIS; **E** - Rastreamento de partículas únicas por SP-IRIS, com controle negativo de marcação MigG; **F** - Detecção por *western blotting* de calnexina (CANX), CD9, CD63 e sintenina de frações obtidas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), comparados ao lisado (Lys) e EVs. **G** - Imagens de EVs por microscopia eletrônica de transmissão (TEM – barra de escala: 100 nm) e super-resolução (SRM – barra de escala: 50 nm). **H** - Luminescência relativa de amostras de SEC contendo EVs. **I** - Quantificação proteica de frações de SEC e EVs. FONTE: Bianca C. Pachane, 2023.

A separação de EVs de células Expi293F-palmGRET ocorreu conforme descrito anteriormente, com resultados similares (Driedonks *et al.*, 2022). As frações enriquecidas com EVs (1-4) foram combinadas para avaliação de nanocitometria de fluxo, onde verificamos a concentração de 4.65×10^{11} partículas/ml e a incidência de 78.7% de partículas EGFP⁺ (Figura 4B). A dispersão de tamanho de EVs teve pico em 76 nm (Figura 4C). O perfil de tetraspaninas foi confirmado por *microarray*, com a expressão de CD81, CD63 e EGFP (Figura 4D-E). Por *western blotting*, identificamos as proteínas CD9, CD63, sintenina e calnexina com os perfis adequados: baixo enriquecimento da proteína específica do retículo endoplasmático, calnexina; e alto enriquecimento de biomarcadores de EVs (Figura 4F). As EVs foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e super-resolução (SRM), demonstrando tamanho, morfologia e fluorescência normais (Figura 4G). Conforme descrito anteriormente, altos níveis de luciferase solúvel foram encontrados em frações tardias da SEC, que também são abundantes em proteínas, em comparação à menor taxa de luciferase e proteínas em frações de EV (Figura 4H-I). Os dados essenciais deste preparo foram depositados na plataforma EVTRACK, sob o ID EV240144 (Van Deun *et al.*, 2017).

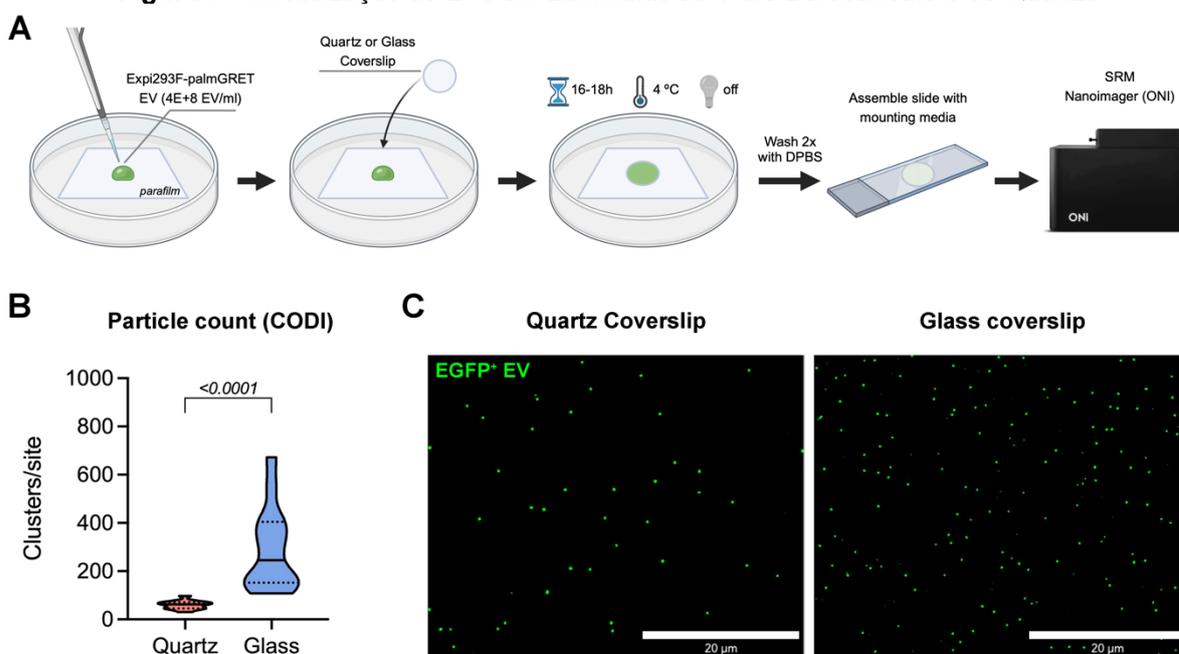
2.4.2 Eficácia da Imobilização de EVs em Vidro

Utilizando o protocolo descrito na Figura 5A, verificamos que EVs podem ser imobilizadas tanto em vidro borossilicato, quanto em vidro de quartzo. Para contagem de partículas, cada lamínula foi imageada em pelo menos seis sítios randômicos por dSTORM, e submetida ao *software* CODI para agregamento dos sinais dos múltiplos planos para identificação de EVs individualizadas. A contagem de partículas detectou em média $59,62 \pm 17,67$ agregados em lamínulas de quartzo e $289,7 \pm 172,3$ agregados em lamínulas de borossilicato, indicando uma diferença estatística significativa na imobilização de EVs ($p < 0.0001$) (Figura 5B). A inspeção das imagens renderizadas indicam a densidade das partículas por plano e confirmam os dados da quantificação de partículas (Figura 5C).

2.4.3 Uniformidade da Imobilização de EVs com PLL

Utilizando a câmara de cultura de 8 poços montada acima de uma lamínula de borossilicato *Schott D 263*, avaliamos os requerimentos do pré-tratamento do vidro com PLL e da utilização de meios de montagem para melhorar a imobilização e visualização de EVs na lamínula. O desenho experimental, que seguiu o diagrama disposto na Figura 6A, nos permitiu avaliar que o meio de montagem (MM) não é necessário para estabilizar amostras para SRM que apresentam o pré-condicionamento com PLL, mas sim para amostras que utilizam apenas EVs adsorvidas diretamente no vidro (Figura 6B). Este resultado sugere que o PBS é um meio viável para imersão de amostras em câmaras de cultivo para dSTORM, se utilizado junto do pré-condicionamento da superfície com PLL.

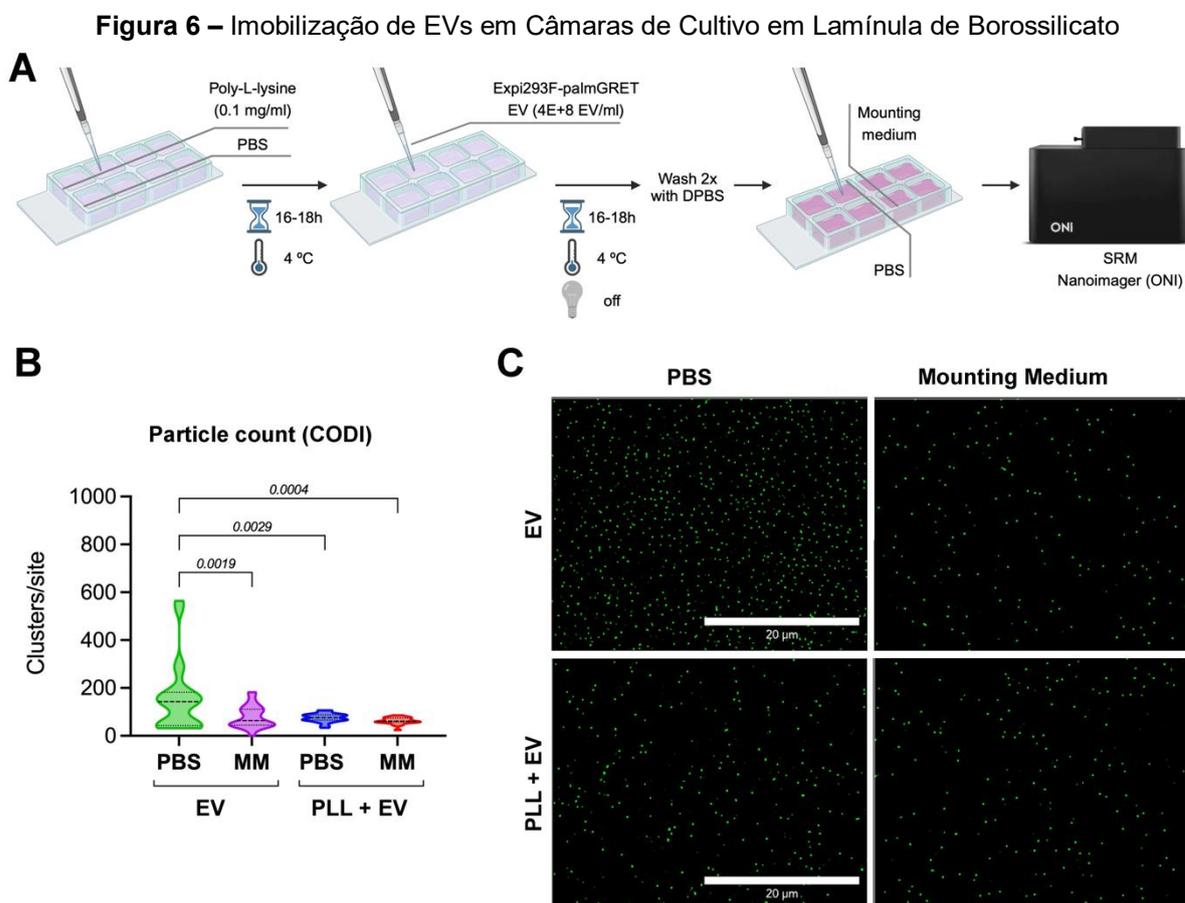
Figura 5 – Imobilização de EVs em Lamínulas de Vidro Borossilicato e de Quartzo



A - Diagrama da preparação de lamínulas cobertas com EV para imageamento por SRM. **B** - Contagem de partículas adsorvida em lamínulas de quartzo e borossilicato, analisadas no software CODI (alto.codi.bio). Valor estatisticamente relevante de p disposto no gráfico. **C** - Imagens renderizadas de dSTORM, mostrando a abundância de EVs (verde) em aumento de 60x e zoom 2x (barra de escala: 20 µm). FONTE: Pachane *et al.* (submetido).

Verificamos também que EVs são capazes de aderirem ao vidro borossilicato mesmo sem adição de PLL: sem PLL, verificamos $157,3 \pm 144,9$ partículas por sítio, enquanto que com PLL, temos $78,83 \pm 45,26$ agregados por sítio. Entretanto, apesar de vermos um aumento na adsorção de EVs na condição sem PLL, seu alto desvio padrão (variando de >50 a 300 partículas por sítio) sugere que o PLL

uniformiza a imobilização de EVs no vidro. Imagens representativas das imagens renderizadas indicam a densidade das partículas por sítio, confirmando os dados de quantificação de partículas (Figura 6C).

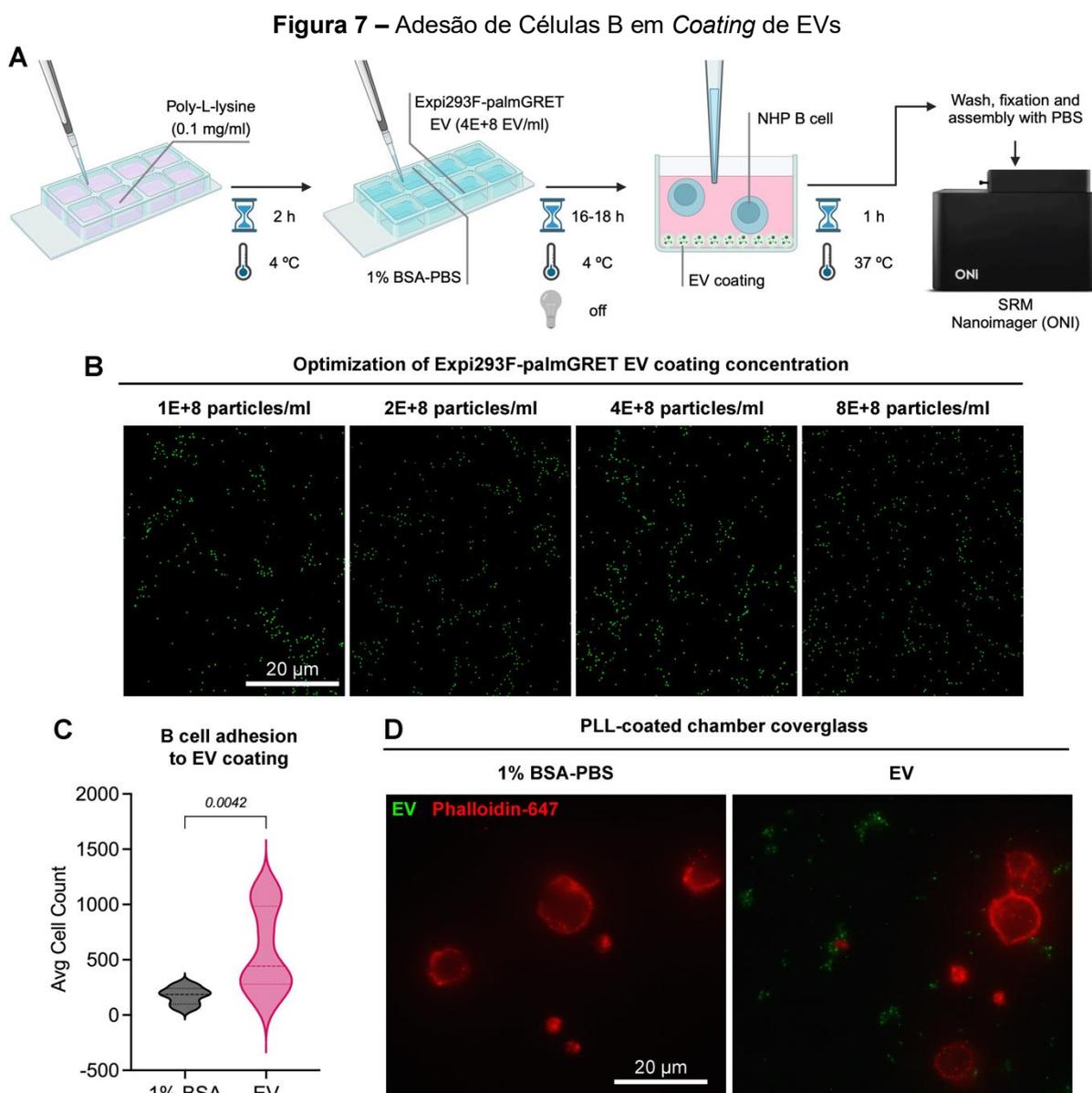


A - Diagrama da preparação de câmaras de cultura em lamínula recobertas com EVs para imageamento por SRM. **B** - Contagem de partículas adsorvidas em borossilicato recoberto com EVs ou PLL e EVs, sob imersão em PBS ou meio de montagem (MM). Análise do software CODI (alto.codi.bio) com valores estatisticamente relevantes de p dispostos no gráfico. **C** - Imagens renderizadas de dSTORM com partículas individualizadas de Expi293F-palmGRET EV (verde), obtidos em aumento de 60x e zoom de 2x (barra de escala: 20 μ m). FONTE: Pachane *et al.* (submetido).

2.4.4 Interação de Células B com EVs Imobilizadas em Vidro

Um ensaio biológico foi realizado para validar a aplicação de EVs imobilizadas em vidro, utilizando uma metodologia previamente aplicada no qual células foram permitidas a interagir com o *coating* de EV por 1 hora (Altei *et al.*, 2020). Neste ensaio, utilizamos células B primárias de primatas não-humanos (*Macaca nemestrina*, NHP), que estavam sendo utilizadas para outros testes (Figura 7A). A

concentração de EVs de 4×10^8 partículas/ml foi escolhida a partir de uma série de diluições (Figura 7B), e foi comparada subsequentemente a um controle negativo (BSA-PBS 1%). Apesar de certas células terem se ligados aos poços dos controles negativos, houve um aumento de 3,3x da adesão de células B em poços recobertos com EV (Figura 7C). A ligação das células ao *coating* também foi confirmado por SRM (Figura 7D).



A - Desenho do ensaio de adesão à EVs. **B** - Otimização da densidade de EVs imobilizada no vidro (verde), em imagens renderizadas de dSTORM obtidas em aumento de 60x e zoom de 2x (barra de escala: 20 µm). **C** - Contagem média de células aderidas ao controle negativo (1% BSA-PBS) e *coating* de EV após 1 hora de incubação. Gráfico em violino com valor de *p* disposto acima da barra comparativa. **D** - Imagens reconstituídas de dSTORM do ensaio de adesão, mostrando EVs (verde) e células B (vermelho) (barra de escala: 20 µm). FONTE: Pachane *et al.* (submetido).

2.5 DISCUSSÃO

Recentemente, a descrição de um novo *plugin* para contagem de partículas utilizando imagens padrão de microscopia de fluorescência demonstrou que a imobilização de EVs ocorre de forma similar em lâminas de vidro de quartzo tradicionais e carregadas positivamente (Schürz *et al.*, 2022). Testamos se resultados similares poderiam ser encontrados em lamínulas de vidro de quartzo e de borossilicato padrão utilizando a técnica dSTORM para verificar a disposição das partículas. Utilizando EVs EGFP⁺, verificamos aumento da mobilização de EVs em lamínulas de vidro borossilicato que em quartzo, sugerindo que o uso de lamínulas de vidro comerciais é viável para análises em que as EVs precisam ser adsorvidas por uma superfície amórfica. Também verificamos que o uso de PLL para pré-tratamento das lamínulas de borossilicato não é essencial, mas auxilia na uniformidade da distribuição de EVs pela superfície. Nossos resultados sugerem que o *coating* de PLL pode contribuir para a ligação de EVs em locais onde a superfície do vidro não é tão homogênea, criando um potencial eletrostático que permite a adesão de EVs (Schermelleh *et al.*, 2019). Em paralelo, observamos que o meio de montagem comercial não é essencial para análise por SRM, podendo ser substituído por PBS para estocar as amostras de microscopia sob imersão por curtos períodos. Em nossa pesquisa, não encontramos outros estudos que investigaram a necessidade do PLL para imobilização de EVs em superfícies vítreas, e poucos avaliaram a interação de EVs com diferentes materiais para análises funcionais.

A preparação das amostras para aplicações específicas, como microscopia TIRF (*total internal reflection fluorescence*) e dSTORM, geralmente requer materiais refinados que melhorem a transmitância óptica sem comprometer o valor da rugosidade da superfície ou sua resistência química (Schermelleh *et al.*, 2019). O quartzo é considerado um material superior para transmitância óptica, entretanto seu alto ponto de amolecimento (1.500 °C) propicia um material mais delicado e custoso (Tang *et al.*, 2021). Uma alternativa comercial é a lamínula tradicional de vidro, feita de vidro borossilicato de alta qualidade e estando disponível em diversos tamanhos e espessuras (por exemplo, de 0,09 a 0,25 mm). A maior parte das lamínulas de vidro são adequadas para microscopia, especialmente se tratadas com PLL na preparação para adesão celular (Mazia; Schatten; Sale, 1975). Verificamos que EVs se ligam mais eficientemente ao vidro borossilicato que ao quartzo por dSTORM, sugerindo que este

material pode ser utilizado no desenvolvimento de novos produtos focados em técnicas de microscopia altamente específicas.

2.6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a imobilização de EVs para técnicas de imageamento altamente específicas podem ser realizadas utilizando materiais padrão de laboratório, como lamínulas de vidro. Essa aplicação simples à microscopia de alta resolução, particularmente ao dSTORM, expande as possibilidades de métodos e aplicações que podem utilizar SRM. Além disso, em conjunto com a similaridade observada na manutenção das amostras por PBS e meio de montagem, verificamos que é possível preparar amostras para SRM com materiais mais baratos de forma equivalente a opções mais refinadas.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES HIPÓXICAS DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA TRIPLO-NEGATIVAS

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Câncer: Definições e Características

Chamamos de câncer um conjunto de doenças decorrentes da desestabilização genômica das células, causando a perda de homeostase celular (Hanahan; Weinberg, 2000). Cânceres são caracterizados por comportamentos celulares determinantes, que propiciam o surgimento e desenvolvimento de tumores. Conforme compilado por Hanahan e Weinberg, as características determinantes do câncer incluem a sustentação de sinalização para proliferação, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, ativação de imortalidade replicativa, indução e acessibilidade à vasculatura, ativação de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e evasão de destruição pelo Sistema Imune (Hanahan; Weinberg, 2000, 2011). Recentemente, características que possibilitam o desenvolvimento tumoral foram propostas para complementar este conceito, como ativação da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não-mutacional, microbiotas polimórficas e senescência celular (Figura 8) (Hanahan, 2022).

As características do câncer são uma generalização do que é visto na clínica e na pesquisa básica: células tumorais surgem a partir de fatores genéticos, hereditários ou ambientais, que levam à perda do seu funcionamento saudável. A célula tumoral passa a se comportar de forma agressiva, proliferando-se constantemente e criando um tecido próprio mediante modulação do microambiente tumoral e das células adjacentes (Hanahan, 2022). Com a progressão da doença, as células periféricas ao tumor são reprogramadas para trabalhar em função dele, permitindo a criação de células associadas ao tumor incluindo macrófagos (TAM), fibroblastos (CAF) e adipócitos (CAAs). Além disso, há o estímulo para a modulação do metabolismo e formação de novos capilares sanguíneos, mediante estimulação de células endoteliais pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Taware *et al.*, 2020).

Figura 8 – Características Determinantes do Câncer



Diagrama das características determinantes do câncer, atualizado para incluir novos tópicos emergentes e possibilitadores da doença. FONTE: Traduzido de Hanahan, 2022.

Apesar dos esforços na formação do tecido tumoral, a perda da homeostase do tecido sugere que o tecido tumoral funcione de forma subótima. A angiogênese tumoral é pouco eficaz, pois a presença constante de fatores pró-angiogênicos é disruptiva à maturação de novos vasos sanguíneos, gerando uma rede de nutrição vascular ineficiente que resulta em escassez nutricional e hipóxia (Lugano; Ramachandran; Dimberg, 2020). Com o estabelecimento da hipóxia intratumoral, severas respostas adaptativas são despertadas e resultam na diferenciação de fenótipos heterogêneos, o que contribui para o aumento da agressividade do tumor (Rundqvist; Johnson, 2013; Taware *et al.*, 2020). Esse processo é comum em tumores sólidos, como no caso dos adenocarcinomas mamários (Nagini, 2017).

3.1.2 Introdução ao Câncer de Mama

Dentre todos os tipos de câncer conhecidos, a neoplasia mais incidente mundialmente é o câncer de mama, sendo responsável por 11,6% de todos os novos casos globais com 2,3 milhões de diagnósticos (Siegel *et al.*, 2023). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que 74 mil novos casos serão detectados no Brasil no triênio 2023-2025, contabilizando o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres, atrás somente de tumores de pele não-melanoma (Estimativa 2023, 2023).

Os casos de câncer de mama estão em constante crescimento desde os anos 2000, resultante parcialmente das melhorias no diagnóstico e pelo aumento da exposição a fatores de risco (Siegel *et al.*, 2023). O diagnóstico precoce de neoplasias, especialmente para pessoas com histórico familiar de câncer ou portadoras de mutações em oncogenes como *brca1* e *brca2*, permite o tratamento do tumor em estágio pré-metastático, o que conseqüentemente reduz seu índice de mortalidade (Mavaddat *et al.*, 2019; Siegel *et al.*, 2023). Entretanto, fatores de risco como exposição prolongada a hormônios, consumo de álcool e obesidade também podem facilitar seu surgimento (Jara *et al.*, 2017; Nagini, 2017).

Tumores sólidos de mama são classificados com base na expressão imunohistoquímica de três receptores hormonais: progesterona (PR), estrogênio (ER) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). A categorização de tumores em luminal A (HER2⁻/ER⁺ ou PR⁺), luminal B (ER⁺/PR⁻/Ki67⁺), HER2 positivo (HER2⁺/ER⁻/PR⁻) ou triplo-negativo (HER2⁻/ER⁻/PR⁻) é essencial para o direcionamento terapêutico, o qual geralmente envolve drogas inibidoras dos receptores mais expressos (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). Cada subtipo de tumor mamário apresenta suas características únicas e predisposição à metástase variadas (Figura 9) (Harbeck *et al.*, 2019).

Figura 9 – Subtipos de Câncer de Mama e suas Características

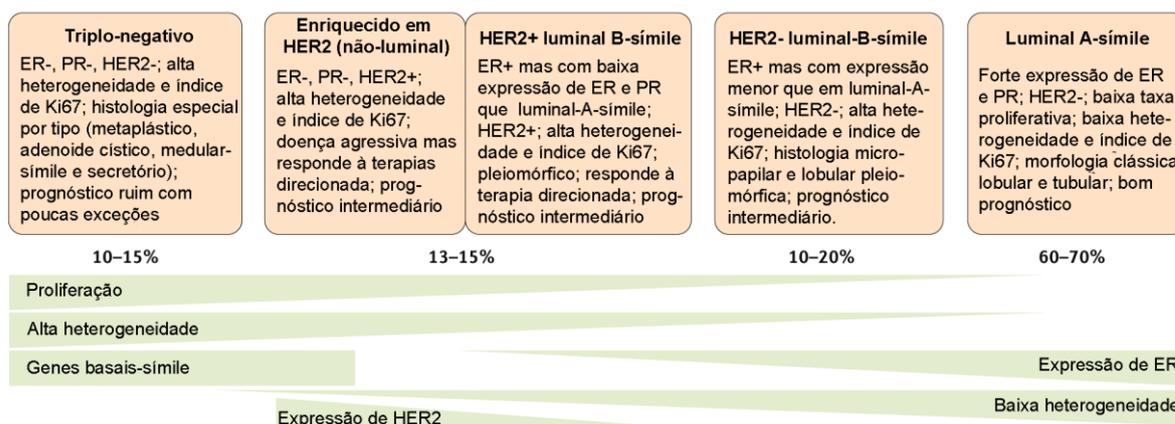


Diagrama adaptado e traduzido com as principais características dos subtipos de câncer de mama.
 FONTE: Harbeck *et al.*, 2019.

No caso do câncer de mama triplo-negativo (TNBC), que não expressa nenhum receptor hormonal e corresponde a 15% dos casos clínicos, o alto índice de reincidência (40%) é resultado de sua insensibilidade à terapia hormonal (Altei *et al.*,

2022). Mais prevalente em mulheres com menos de 40 anos, afro-descendentes ou que apresentam mutações dos genes *brca1-2*, os tumores triplo-negativos são mais heterogêneos e agressivos, o que aumenta suas chances de metástase (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). Atualmente, o tratamento do TNBC não possui terapia direcionada específica, e os tumores são majoritariamente tratados com quimioterapia utilizando antraciclinas e taxanos (Altei *et al.*, 2022).

3.1.3 Papel das EVs no Câncer de Mama

No câncer de mama, particularmente no TNBC, o desenvolvimento e progressão dos tumores são atrelados à ação e função de EVs secretadas pelo tecido neoplásico (Quail; Joyce, 2013). Conforme discutido no Capítulo 1, tumores utilizam as vias de secreção de EVs como forma de escape ao estresse nutricional e metabólico, o que aumenta sua secreção em comparação a células em tecidos saudáveis (King; Michael; Gleadle, 2012; Kucharzewska; Belting, 2013). Além disso, a redução da disponibilidade de oxigênio devido à proliferação contínua e baixa eficiência da vasculatura tumoral, com subsequente estabelecimento de hipóxia, estimula ainda mais a secreção de EVs e interfere diretamente em sua composição (de Jong *et al.*, 2012; King; Michael; Gleadle, 2012; Zhang *et al.*, 2021).

A importância de EVs no câncer de mama é conhecida desde o final do século XX, quando componentes importantes para a invasão tumoral foram detectados em vesículas, como a enzima MMP-9 e a integrina β_1 (Dolo *et al.*, 1998). Além disso, verificou-se a correlação positiva entre o conteúdo proteolítico de EVs tumorais e o potencial invasivo do tumor originário (Dolo *et al.*, 1998). Com isso, a hipótese de que EVs tumorais seriam potenciais indicadores do prognóstico tumoral foi investigada. Além dessa função, EVs tumorais de mama já foram implicadas em múltiplas etapas da tumorigênese, especialmente na migração celular, processo fundamental para o surgimento de metástases (Sung *et al.*, 2020).

Com base nessas informações, buscamos a caracterização abrangente do nosso objeto de estudo: EVs isoladas de uma linhagem modelo de TNBC, denominada MDA-MB-231, sob situação de hipóxia atmosférica a 1% O_2 (i.e., SEVh). Essas amostras foram comparadas em relação à partículas separadas de células cultivadas sob condições normais (~20% O_2 , i.e.: SEVn), conforme as recomendações do MISEV (Théry *et al.*, 2018; Welsh *et al.*, 2024). Realizamos a análise do proteoma

das EVs, e padronizamos as condições para futuras análises de seus lipidomas e metabolomas. Os resultados descritos neste capítulo foram publicados em periódico indexado, em conjunto aos resultados do Capítulo 4 (Pachane *et al.*, 2022) (Anexo B).

3.2 OBJETIVOS

Fornecer uma caracterização abrangente de vesículas extracelulares derivadas de células MDA-MB-231 cultivadas em hipóxia, comparando-as com EVs isoladas sob condições normóxicas.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Efetuar o isolamento de EVs do meio condicionado de células MDA-MB-231 por meio de ultracentrifugação diferencial e filtração;
- Caracterizar vesículas extracelulares tumorais de mama triplo-negativas isoladas em hipóxia e normóxia conforme as recomendações do MISEV;
- Comparar o proteoma de vesículas extracelulares tumorais de hipóxia e normóxia;
- Padronizar a preparação de amostras de EVs para análises metabolômica e lipidômica.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Cultivo Celular

Células de adenocarcinoma mamário triplo-negativo humanos da linhagem MDA-MB-231 (ATCC[®] CRM-HTB-26[™]) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dubecco (DMEM) com glicose (i.e., DMEM suplementado com D-glicose [4,6 g/L], piruvato de sódio [1 mM] e FBS [soro fetal bovino, 10%]). As células foram mantidas entre passagens 50 e 80 em frascos de cultivo a 37 °C, em atmosfera com 5% CO₂ com jaqueta de água (*Model 3110 Spectrum Series II Water Jacket CO₂*, Thermo-Fisher Scientific).

Estoques celulares foram mantidos sob criogenia em FBS/DMSO (dimetilsulfóxido, 9:1, v/v) e seu cultivo foi estabelecido mediante descongelamento de amostras em frascos de cultivo, os quais foram incubados por 12-18 horas para adesão em monocamada. O meio foi substituído no dia seguinte e as células foram mantidas até atingirem confluência de $\geq 90\%$, quando foram submetidas ao repique com breve exposição à tripsina-EDTA 0,1%, seguida de bloqueio com meio de cultivo. A suspensão celular foi coletada, centrifugada a 1.200 rpm por 5 minutos e o decantado foi ressuspenso em meio de cultivo. Uma alíquota foi misturada ao corante *trypan blue* 0,4% (Sigma-Aldrich) na proporção 1:1 (v/v) e aplicada em lâminas para contagem automatizada (*TC20 Automated Cell Counter*, Bio-Rad). Para cultivo, 10⁶ células foram semeadas em frascos de 75 cm² utilizando 10 ml de meio e repiques foram realizados a cada 3-4 dias.

3.3.1.1 Ensaio de Detecção de *Mycoplasma* por Hoechst 33258

Para manutenção do controle de qualidade de cultivo, células foram rotineiramente submetidas para detecção de *Mycoplasma* por microscopia de fluorescência, utilizando o corante *Hoechst 33258* (Young *et al.*, 2010). Duas mil células foram semeadas em placas de 96 poços em meio de cultivo e incubadas para adesão por 24 horas em estufa a 37 °C, 5% CO₂. O meio foi retirado e as células foram fixadas com solução metanol-ácido acético (3:1, v/v) em temperatura ambiente por 10 minutos. A placa foi deixada aberta por 2 minutos para secagem antes da adição de *Hoechst 33258* (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich) por 30 minutos, em temperatura ambiente,

no escuro. Após três lavagens em tampão fosfato salino (PBS), as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Vert.A1, software AxioVision Rel 4.8, Carl Zeiss) utilizando o filtro DAPI, nos aumentos de 20x e 40x. Células contaminadas com *Mycoplasma* foram descartadas.

3.3.2 Separação de Vesículas Extracelulares

O plaqueamento de células MDA-MB-231 para separação de EVs foi realizado em meio livre de vesículas exógenas. Para tal, alíquotas de FBS foram centrifugadas a 100.000 x g por 18 h a 4 °C, utilizando frascos específicos para o rotor *Type 45 Ti* (#355622, Beckman Coulter) da ultracentrífuga *Optima XE-90* (Beckman Coulter). O sobrenadante depletado (UC-FBS) foi coletado e filtrado duplamente (0,22 µm) sob condições estéreis. O meio de plaqueamento consistiu em DMEM suplementado com D-glicose (4,6 g/L), piruvato de sódio (1 µM) e UC-FBS (10%).

Células MDA-MB-231 (2 x 10⁵ células/ml) foram semeadas em frascos T150 contendo 20 ml de meio de plaqueamento e mantidas por 24 horas em incubadoras a 37 °C, 5% CO₂, sob condições atmosféricas normóxicas (~20% O₂) ou hipóxicas (1% O₂; *H35 Hypoxystation*, Don Whitley). Após lavagem com PBS, o meio foi substituído por *OptiMEM I Reduced Serum Medium* (Gibco) e os frascos foram retornados às suas respectivas condições atmosféricas por 48 horas. O meio condicionado (CM) foi coletado em tubos cônicos e mantidos a 4 °C para processamento imediato. As células de três frascos aleatórios foram contadas como controle de isolamento.

O isolamento de EVs foi realizado por ultracentrifugação diferencial (Théry *et al.*, 2006). O CM foi centrifugado em quatro etapas: (1) 200 x g por 5 minutos a 4 °C (rotor F-35-6-30, centrífuga 5430R; Eppendorf); (2) 2.000 x g por 25 minutos a 4 °C (rotor F-35-6-30, centrífuga 5430R; Eppendorf); (3) 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C (rotor *Type 45 Ti*, ultracentrífuga *Optima XE-90*; Beckman Coulter); e (4) 150.000 x g por 2 horas a 4 °C (rotor *Type 45 Ti*, ultracentrífuga *Optima XE-90*; Beckman Coulter). Os decantados das etapas (2), (3) e (4), correspondentes às vesículas extracelulares grandes (LEV), médias (MEV) e pequenas (SEV), foram ressuspensos em PBS e re-centrifugados em suas respectivas condições. Ao final, as vesículas foram ressuspensas em PBS filtrado e estocadas em -80 °C (Figura 10).

Figura 10 – Isolamento de EVs por Ultracentrifugação Diferencial

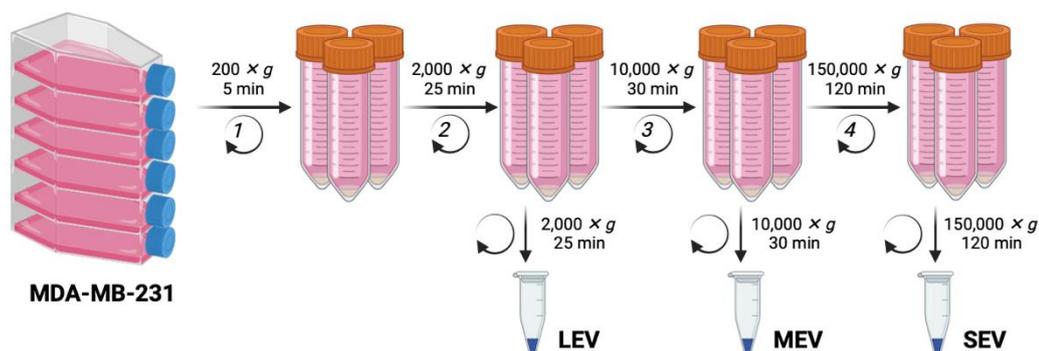


Diagrama experimental produzido em BioRender.com, com setas circulares indicando etapas de centrifugação. FONTE: Bianca C. Pachane (2023).

3.3.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas – NTA

A contagem de partículas e dispersão de tamanho de amostras de EV foram realizadas no equipamento *Nanosight NS300* (Malvern Panalytical) com o *software* NTA (versão 2.3, *build* 0033). EVs foram diluídas em água ultrapura (1:1.000 a 1:4.000) e injetadas no módulo de análise com auxílio de uma seringa de 1 ml. O movimento browniano das partículas foi analisado por meio de cinco capturas de 60 segundos, utilizando os parâmetros a seguir: *screen gain*: 2.0, *camera level*: 14, *blur*: auto, *max jump distance*: 14.6, *min track length*: auto. O processamento dos dados foi realizado com *screen gain* de 10.0 e limiar de detecção de 4.0.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM

Seguindo a metodologia derivada de (Théry *et al.*, 2006), EVs foram diluídas em PBS (1:2, v/v) e depositadas sobre grids de cobre recobertos com formvar e carbono (Ted Pella) por 20 minutos, em temperatura ambiente. A amostra foi fixada no grid com 2% PFA-PBS por 20 minutos em temperatura ambiente, e lavada extensivamente com água deionizada. Os grids foram expostos à solução de acetato de uranila (4%, pH 4) em metilcelulose (2%) por 10 minutos, no escuro e em gelo. Em seguida, as amostras foram secas em temperatura ambiente *overnight*. Os grids foram recobertos com uma fina camada de ouro para visualização no microscópio eletrônico de transmissão *FEI TECNAI G² F20 HRTEM*, em aumento de 40.000x.

3.3.5 Western Blotting Qualitativo

Amostras de lisados celulares e EVs (10 µg) foram misturadas em tampão Laemmli (Tris 0,2 M; SDS 4%; glicerol 200 g/L; DTT 0,16 M; *bromophenol blue* 0,2 mg/ml; *pyronin Y* 0,2 mg/ml) em condições redutoras (1:4, v/v) e desnaturadas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas a géis SDS-PAGE 10% junto do padrão proteico *Precision Plus Protein™ Dual-Color* (Bio-Rad), e corridos em tampão de corrida para eletroforese a 100 V por cerca de 2 horas. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm, Bio-Rad) em sistema úmido (Tris 2,5 mM, glicina 2 M, metanol 20% [v/v]; pH 7,6) por 2,5 horas a 100 V, 4 °C. A confirmação da transferência foi realizada mediante coloração da membrana com *Ponceau S* por 2 minutos, seguido de descoloração com água destilada para documentação utilizando o equipamento *ChemiDOC™ XRS+* (Bio-Rad).

As membranas foram bloqueadas com BSA 3% em tampão Tris salino com *Tween® 20* (TBST) por pelo menos 1 hora sob agitação, em temperatura ambiente. A caracterização de EVs foi realizada com quatro proteínas de interesse (Tabela 1). Os anticorpos primários foram diluídos em BSA-TBST 3% e expostos às membranas por 18 horas, em agitação, à 4 °C.

Tabela 1 – Anticorpos Primários Utilizados em *Western Blotting* Qualitativo

Alvo	Diluição	Fabricante	Código
ALIX	1:1.000	Abcam	186429
Calnexina	1:1.000	Cell Signaling	mAb 2679
CD63	1:1.000	Abcam	59479
Flotilina-1	1:1.000	BD Biosciences	610820

FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

As membranas foram lavadas quatro vezes com TBST por 5 minutos em agitação e expostas por 1 hora em temperatura ambiente aos anticorpos secundários conjugados com HRP, diluídos em leite desnatado (5%) em TBST, específicos para detecção dos primários produzidos em coelho (*Goat anti-Rb*, diluição 1:10.000, #97051, Abcam; e diluição 1:15.000, #205718, Abcam) ou camundongo (*Goat anti-Ms*, diluição 1:10.000, #97040, Abcam). Após quatro lavagens de 10 minutos em agitação no TBST, as membranas foram reveladas mediante exposição aos substratos *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad) e *SuperSignal™ West Femto*

(Thermo-Fisher Scientific) por 2 minutos. A reação de quimiluminescência foi documentada (*ChemiDoc™ XRS+*, Bio-Rad) e as membranas foram processadas no *software ImageLab* (Bio-Rad).

3.3.6 Proteômica

3.3.6.1 Extração de Proteínas

Três preparações diferentes de SEV isoladas em normóxia (SEV_n) ou hipóxia (SEV_h) contendo aproximadamente 200 µg de proteínas foram aplicadas à colunas *Amicon® Ultra 0.5 (3000 NMWL)*, Millipore) e concentrados a 14.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Após eluição das amostras a 1.000 x g por 2 minutos a 4 °C, as mesmas foram re-quantificadas por método microBCA (ver 2.3.3.2) e misturadas ao surfactante *RapiGest SF* (0,2%, Waters) a 80 °C por 15 min. Em seguida, as amostras foram incubadas com ditioneitol (DTT 100 mM, Bio-Rad) por 30 minutos a 60 °C, e com iodocetamida (IAA 300 mM, GE) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os peptídeos foram digeridos com tripsina (0,05 µg/µl) em bicarbonato de amônio 50 mM por 18 horas a 37 °C, transferidos para frascos MS, liofilizados e mantidos a -80 °C.

3.3.6.2 Proteômica *Label Free* por LC-MS

O extrato de peptídeos foi ressuscitado em 20 mM de formiato de amônio (pH 10) e separados no sistema de *LC NanoElute* (Bruker Daltonik) acoplado ao espectrômetro de massa híbrido TIMS-quadrupolo TOF (*timsTOF Pro*, Bruker Daltonik) (Meier *et al.*, 2018). Como fonte de ionização, utilizamos o *nano-eletrospray Captive Spray* (Bruker Daltonik).

Para corridas longas de gradiente (i.e., 2 horas), os peptídeos foram separados em coluna *Aurora* de fase reversa (25 cm x 75 µm ID, 1,9 µm, Ion Opticks) sob fluxo de 300 nl/min em compartimento aquecido a 50 °C. A coluna foi equilibrada com 4 volumes de reagente A antes do uso. A análise de proteomas completos a partir de amostras digeridas foi realizada em gradiente linear, iniciando com 2% do tampão B e subindo em incrementos lineares para 17% de B em 60 minutos, 25% de B em 30 minutos, 37% de B em 10 minutos, e 95% B em 10 minutos. O reagente B foi mantido constantemente a 95% por 10 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado em modo PASEF dado-dependente (Meier *et al.*, 2015) com 1 *survey* TIMS-MS e 10 PASEF MS/MS *scans* por ciclo de aquisição. Nós analisamos a dispersão da mobilidade de íons de $1/K_0 = 1,6$ a $0,6 \text{ cm}^2/\text{V.s}$ usando tempos iguais de acumulação iônica e rampa no analisador TIMS a 100 ms cada. Ions precursores adequados para análise por MS/MS foram isolados em uma janela de 2 Th para $m/z < 700$ e 3 Th para $m/z > 700$, ao rapidamente trocar a posição do quadrupolo *in tandem* com a eluição dos precursores no equipamento de TIMS. A energia de colisão foi reduzida em *steps* com a função do aumento da mobilidade iônica, iniciando em 20 eV para $1/K_0 = 0,6 \text{ cm}^2/\text{V.s}$ e 59 eV para $1/K_0 = 1,6 \text{ cm}^2/\text{V.s}$. As informações de mobilidade iônica e m/z foram utilizadas para excluir íons precursores de carga única com um filtro poligonal, além de utilizarmos a “exclusão dinâmica” para evitar o re-sequenciamento de precursores que atingiram o “valor alvo” de 20.000 a.u. A dimensão da mobilidade iônica foi calibrada de forma linear utilizando três íons do *Agilent ESI LC-MS tuning mix* (m/z , $1/K_0$: 622,0289, $0,9848 \text{ cm}^2/\text{V.s}$; 922,0097, $1,1895 \text{ cm}^2/\text{V.s}$; e 1221,9906, $1,3820 \text{ cm}^2/\text{V.s}$).

3.3.6.3 Processamento de Dados e Bioinformática

Os espectros gerados em MS foram processados com o arquivo em formato FASTA do banco de dados *UniProt Complete HUMAN Proteome* (The UniProt Consortium, 2019) utilizando o programa *MaxQuant* (Tyanova; Temu; Cox, 2016). Após identificação dos espectros, proteínas reversas e dados incompletos foram excluídos pela ferramenta *Perseus* (Tyanova *et al.*, 2016), bem como proteínas encontradas em até 50% dos brancos ($n=8$). Os dados de intensidade dos picos foram normalizados por contagem de íons totais.

$$\text{TIC} = \frac{\text{intensidade de pico individual}}{\sum \text{intensidade de pico total}} \quad (1)$$

Na plataforma *MetaboAnalyst* (Pang *et al.*, 2022), os dados foram transformados em $-\log_{10}$, dimensionados por método de Pareto e submetidos à análise estatística univariada, utilizando teste t paramétrico e *fold-change*. A análise do componente principal (PCA) foi aplicada para validar os componentes de variância entre as amostras.

Os dados estatisticamente relevantes foram distribuídos em gráficos *heatmap* (GraphPad Prism v. 9.3.1) e a análise de enriquecimento, junto da criação de redes neurais, foi desenvolvida nas bases de dados *String-DB* (Szklarczyk *et al.*, 2023) e *Reactome* (Milacic *et al.*, 2024). As taxas de descobertas falsas (FDR) foram consideradas como requerimentos de confiança para análises de enriquecimento. Os dados de proteômica foram depositados no consórcio *ProteomeXchange* (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>, acesso em: 07/04/2024) pelo repositório parceiro PRIDE (Perez-Riverol *et al.*, 2022), sendo identificado pelo código PXD035244.

3.3.7 Lipidômica

A extração de lipídios de EVs foi realizada por exposição a 400 µl de metanol:água HPLC (1:1 v/v) a -30 °C por 4 minutos no gelo. Os tubos passaram por três rodadas de mistura por 1 minuto em vórtex e incubação por 30 minutos a -80 °C. Em seguida, adicionamos 400 µl de clorofórmio HPLC às amostras, que foram agitadas em vórtex por 1 minuto e centrifugadas por 15 minutos a 15.000 x g, 4 °C. A fase inferior foi transferida para um frasco de MS, liofilizada e congelada a -80 °C. As amostras foram ressuspendidas em solução clorofórmio-metanol (2:1, v/v) e aplicadas em quintuplicata técnica em placas de MALDI. Como matriz, utilizamos DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico). A placa de MALDI foi analisada pelo espectrômetro de massas *MALDI-TOF/TOF 5800 System* (Sciex).

3.3.8 Metabolômica

3.3.8.1 Extração de Metabólitos

EVs decantadas após lavagem a 150.000 x g foram congeladas em nitrogênio líquido para extração de metabólitos, utilizando o solvente de extração metanol:clorofórmio:água (3:1:1, v/v/v). Como padrões internos, utilizamos os compostos isotropicamente marcados: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1,2,3-¹³C₃, 99% - CLM 3665-0.5) e ácido palmítico (1,2,3,4-¹³C₄), preparados na concentração de 1 mg/ml. Uma esfera magnética de tungstênio foi adicionada ao tubo contendo o material triturado, que foi mantido sob agitação no

equipamento *Vibration Mill* (Retsch) à 20 Hz por 30 segundos. Adicionamos 500 µl de solvente gelado e os tubos foram novamente agitados a 20 Hz por 45 segundos. Os tubos foram sonicados por 15 minutos a 4 °C e as esferas foram removidas para centrifugação das amostras a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana com poro 0,22 µm e armazenado a -80°C até o momento da análise.

Uma alíquota de 100 µL das amostras de metabolitos foi transferida para *vials* de vidro (1,5 ml) e liofilizada. Para a derivatização da amostra, adicionamos 20 µl de metoxiamina (15 mg/ml) em piridina, agitamos por 1 minuto e mantivemos a amostra em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no escuro. Para sililação, adicionamos 30 µl de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras foram mantidas em repouso por 1 hora no escuro. Posteriormente, foram adicionados 30 µl de heptano. Uma série de alcanos (C12 – C40) foi utilizada para calcular os índices de retenção.

3.3.8.2 Teste de Metabolômica por GC-MS

As amostras derivatizadas foram automaticamente injetadas no modo *splitless* em cromatógrafo gasoso (8890GC, Agilent Technologie), equipado com uma coluna de sílica fundida de 20 m comprimento x 0,18 mm diâmetro interno x 0,18 µm de filme (Agilent J&W Scientific). A injeção da amostra (1 µl) foi realizada a 280 °C, sob fluxo de 20 ml/min, iniciado após 300 s da aquisição dos dados. A temperatura inicial da primeira coluna foi de 80 °C por 2 minutos, sendo aumentada 15 °C por minuto até atingir 305 °C e manter-se por 2 minutos à essa temperatura. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do espectrômetro de massas GC-TOFMS (Pegasus BT, Leco). Como parâmetros, utilizamos a temperatura da fonte de íons à 250 °C, feixe de elétrons a 70 eV, corrente de ionização de 2,0 mA e 20 espectros por segundo registrados na faixa de 45-800 m/z, voltagem do detector a 1500 V.

3.3.8.3 Processamento de Dados

O processamento dos dados de GC-MS foi realizado no programa *ChromaTOF for BT* (v. 1.2.0.6), no qual foi realizada correção da linha de base, deconvolução, obtenção do índice de retenção (RI), correção do tempo de retenção,

identificação e alinhamento de picos e identificação dos metabólitos com o auxílio da biblioteca da NIST (v. 2.4, 2020). Foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com três ou mais massas características e com *score* igual ou maior a 800. A análise de enriquecimento foi realizada no *módulo Pathway Analysis* da plataforma *MetaboAnalyst* (Pang *et al.*, 2022).

3.3.9 Análise Estatística

Os dados obtidos em ensaios quantitativos foram submetidos à teste de normalidade de Shapiro-Wilk para determinação da distribuição gaussiana. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey, e apresentados como média \pm desvio padrão. A análise dos dados e gráficos foi realizada no *software GraphPad Prism* (v. 9.3).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Caracterização de EVh e EVn de MDA-MB-231

As preparações de EV de MDA-MB-231 foram documentadas e caracterizadas seguindo as recomendações do MISEV2019 e os dados relevantes de todas as amostras utilizadas nos experimentos foram depositadas no repositório EV-TRACK sob os IDs EV220177 e EV240149 (Théry *et al.*, 2018; Van Deun *et al.*, 2017). O objetivo deste trabalho foi o estudo de SEV, portanto amostras de LEV e MEV foram utilizadas apenas para fins comparativos.

O isolamento de EVs em normóxia e hipóxia ocorreu a partir de preparações similares de MDA-MB-231, sem alterações significativas de densidade e viabilidade celular (Tabela 2). Maiores concentrações de partículas e proteínas foram observadas em EVs hipóxicas que em normóxia; por exemplo, SEVh é 25% mais abundante que SEVn (Tabela 2, Figura 11A-B). O enriquecimento proteico das amostras, entretanto, é similar; SEV apresentou enriquecimento para ALIX, CD63 e flotilina-1, e calnexina não foi detectada (Figura 11C).

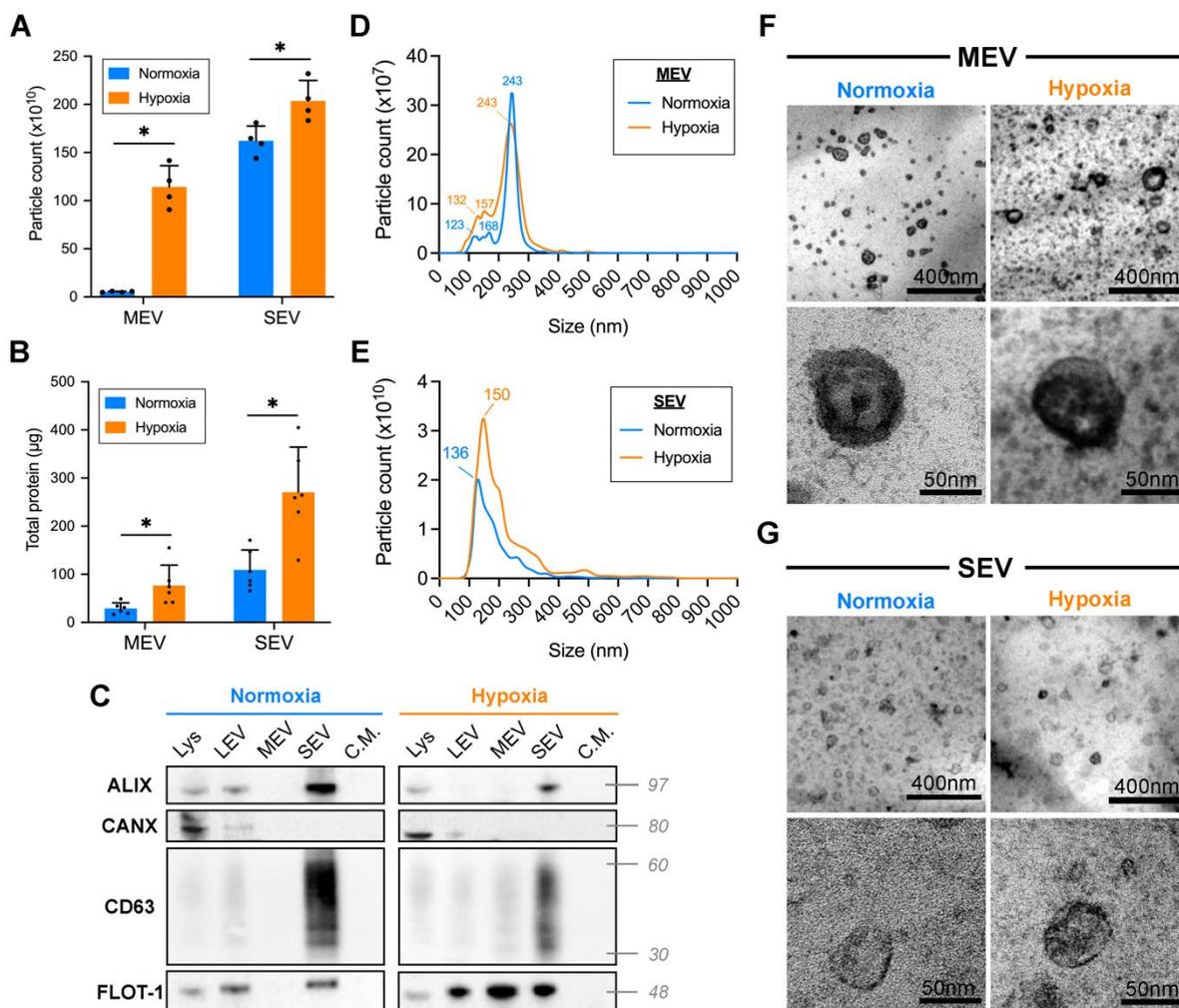
Tabela 2 – Caracterização Quantitativa de EVs

Tipo de EV	Total células	Viabilidade celular (%)	Contagem de partículas	Diâmetro médio (nm)	Quantidade de proteína (µg)
MEVh	$1,94 \times 10^7 \pm 0,48 \times 10^6$	$94,0 \pm 4,3$	$1,14 \times 10^{12} \pm 2,2 \times 10^{11}$	$235,5 \pm 39,3$	$76,8 \pm 42,2$
MEVn	$1,98 \times 10^7 \pm 0,54 \times 10^6$	$96,3 \pm 2,6$	$5,23 \times 10^{10} \pm 5,8 \times 10^9$	$243,9 \pm 16,5$	$28,8 \pm 11,9$
SEVh	$1,94 \times 10^7 \pm 0,48 \times 10^6$	$94,0 \pm 4,3$	$2,03 \times 10^{12} \pm 2,1 \times 10^{11}$	$162,0 \pm 41,5$	$270,5 \pm 93,9$
SEVn	$1,98 \times 10^7 \pm 0,54 \times 10^6$	$96,3 \pm 2,6$	$1,62 \times 10^{12} \pm 1,5 \times 10^{11}$	$151,8 \pm 38,5$	$109,0 \pm 41,47$

FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

A análise de partículas diferenciou as populações de MEV e SEV, validando a nomenclatura utilizada (Tabela 2, Figura 11D-E). A visualização das partículas por TEM permitiu a validação de tamanho, concentração e morfologia, apresentando bordas mais elevadas e lúmen colabado gerados como artefatos da desidratação da amostra no preparo dos *grids*.

Figura 11 – Caracterização de EVs de MDA-MB-231



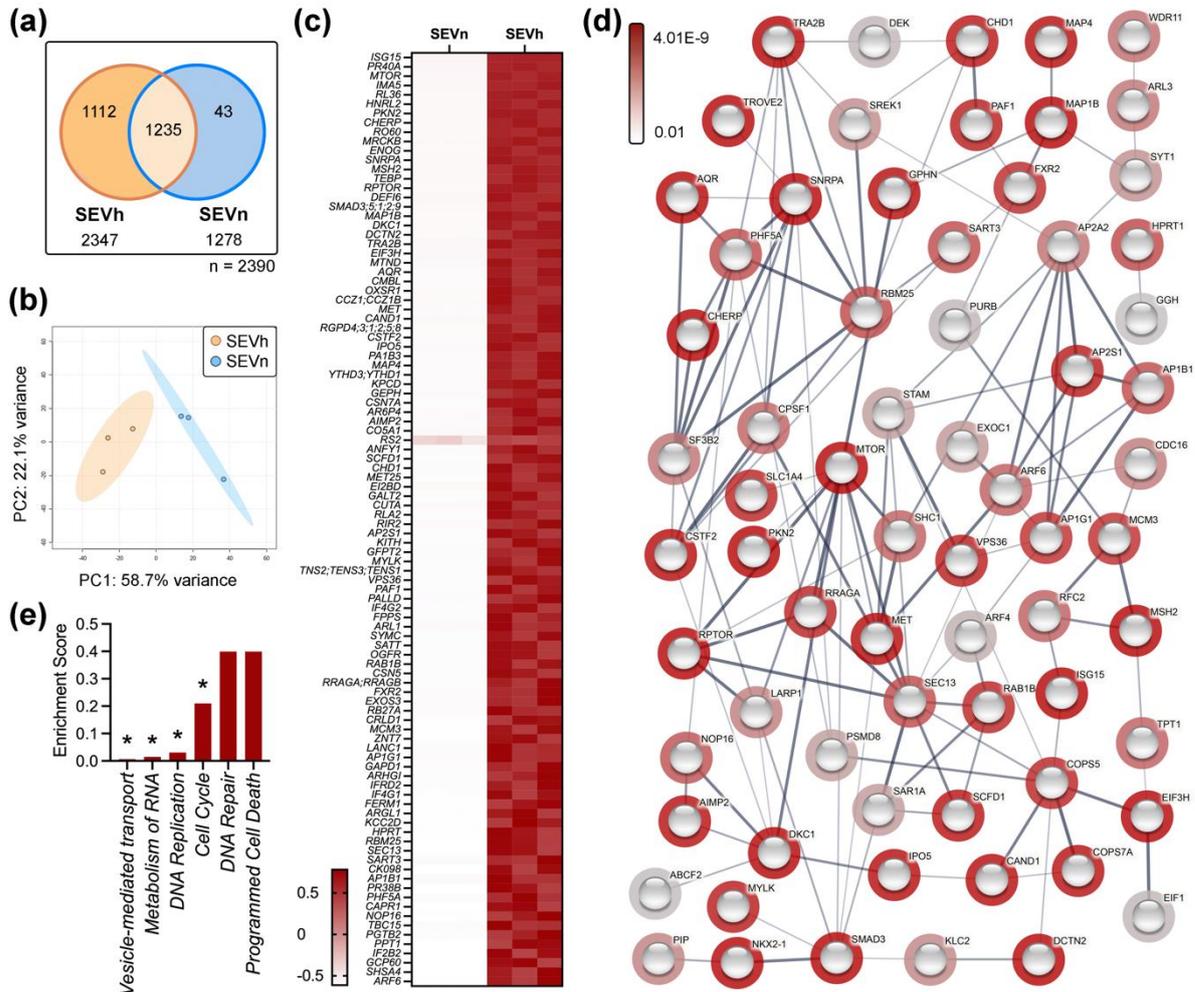
A - Contagem de partículas de MEV e SEV em normóxia (azul) e hipóxia (laranja). **B** - Conteúdo proteico de MEV e SEV. **C** - Identificação das proteínas ALIX, calnexina (CANX), CD63 e flotilina-1 (FLOT-1) por *western blotting* de lisados celulares (Lys), LEV, MEV, SEV e CM. **D-E** - Dispersão da concentração de partículas por tamanho para MEV e SEV, respectivamente. **F-G** - Imagens de TEM para MEV e SEV em campo aberto (acima, barra de escala: 400 nm) e fechado (abaixo, barra de escala: 50 nm). n=5. **p* < 0,05. FONTE: Pachane *et al.*, 2022 (modificado).

3.4.2 Proteoma Comparativo de SEVh e SEVn

Identificamos 2.390 proteínas em SEV, com 2.347 proteínas em hipóxia e 1.278 proteínas em normóxia. Delas, 1.235 proteínas foram encontradas em comum nos dois grupos, 1.112 proteínas foram exclusivas de SEVh e 43 exclusivas de SEVn (Figura 12A). Dez biomarcadores de EV foram identificados nas amostras sem perfil dominante: ADAM10, ALIX, CD47, CD63, CD81, CD82, CD9, FLOT-1, FLOT-2 e TSG101. O componente principal de análise (PCA) diferenciou as replicatas de SEVh

e SEVn, determinando valores de componente principal (PC) a 58,7%, 22,1%, 10,1%, 5,7% e 3,3% da variância designada (Figura 12B). As 10 proteínas mais expressas em cada condição estão destacadas na Tabela 3.

Figura 12 – Proteoma Comparativo de SEVh e SEVn



A - Diagrama de Venn com a distribuição proteica de SEV. **B** - Score do componente de análise principal (PCA). **C** - Heatmap das 100 proteínas mais expressas em SEVh ($p < 0,01$). **D** - Mapa de interações das 144 proteínas mais expressas em SEV, criado no String-DB. Os halos indicam a força dos valores de p conforme a análise estatística dos dados normalizados. A espessura das linhas demonstram a confiança das interações. **E** - Análise de enriquecimento realizada no Reactome, indicando as vias mais reguladas pelo proteoma de SEVh. * $p < 0,05$. FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

Em análise univariada, identificamos 552 proteínas estatisticamente distintas entre SEVh e SEVn ($p < 0,05$), das quais as 114 primeiras ($p < 0,01$) participaram da análise de enriquecimento (Figura 12C-D, Tabela 4). Dentre as proteínas mais expressas, identificamos ISG15 (FDR: $9,59 \times 10^{-6}$), mTOR (FDR:

0,00036) e RPTOR (FDR: 0,00105). Duas famílias proteicas, SMAD (FDR: 0,00112) e RGDP (FDR: 0,00167), também foram detectadas.

Tabela 3 – Dez proteínas com maior score em SEV

	SEVn		SEVh	
	Proteína	TIC	Proteína	TIC
1	VPS36	182398.876	VPS36	87098.4662
2	TBCA	64744.1428	CD166	41929.7595
3	CD166	34908.766	TBCA	40667.1002
4	INGR1	22407.5572	INGR1	21227.2292
5	PDIA4	21568.649	JAK1	18779.9353
6	RL27A	19819.7893	SRSF7	15150.4991
7	SF01	16015.1393	TEBP	14386.82
8	TAXB1	15596.2606	SF01	13992.607
9	MGST1	15489.8122	EGLN	13057.0272
10	ADHX	15429.475	PR38B	13001.8701

Fonte: Bianca C. Pachane, 2022

A análise de enriquecimento indicou o favorecimento das vias de sinalização de mTOR (RRAGB, RPTOR, MTOR e RRAGA; FDR: 0,0027), TGF- β (SMAD2, SMAD3, SMAD9, SMAD1 e SMAD5; FDR: 0,0035) e VEGFA/VEGFR2 (ABCF2, FXR2, AP2S1, SHC2, ARF6, ARF4, MTOR, CDC42BPB, STAM, SHC1 e EIF3H; FDR: 0,0037). De forma significativa, vias relacionadas ao transporte mediado por vesículas (FDR: 0,0067), metabolismo de RNA (FDR: 0,015), replicação do DNA (FDR: 0,0301) e ciclo celular (FDR: 0,21) estão favorecidas em SEVh (Figura 12E).

Tabela 4 – Proteoma Diferencialmente Expresso em SEVh ($p < 0,01$)

Código	Nome da proteína (em inglês)	t.stat	p value	$-\log_{10}(p)$	FDR
ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15	196,650	4,01E-09	8,397	9,59E-06
PR40A	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	80,288	1,44E-07	6,841	1,72E-04
MTOR	Serine/threonine-protein kinase mTOR	60,318	4,52E-07	6,344	3,60E-04
IMA5	Importin subunit alpha-5	48,570	1,08E-06	5,969	5,40E-04
RL36	60S ribosomal protein L36	47,965	1,13E-06	5,947	5,40E-04
HNRL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	40,705	2,18E-06	5,662	8,42E-04
PKN2	Serine/threonine-protein kinase N2	38,313	2,77E-06	5,557	8,42E-04
CHERP	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	35,985	3,56E-06	5,449	8,42E-04

Tabela 4 – Proteoma Diferencialmente Expresso em SEVh ($p < 0,01$) (continuação)

Código	Nome da proteína (em inglês)	t.stat	p value	-log ₁₀ (p)	FDR
RO60	RNA-binding protein RO60	35,466	3,77E-06	5,423	8,42E-04
MRCKB	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	34,954	4,00E-06	5,398	8,42E-04
ENOG	Gamma-enolase	34,607	4,16E-06	5,381	8,42E-04
SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	34,466	4,23E-06	5,374	8,42E-04
MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2	33,412	4,79E-06	5,320	8,80E-04
TEBP	Prostaglandin E synthase 3	30,983	6,47E-06	5,189	1,05E-03
RPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR	30,832	6,59E-06	5,181	1,05E-03
DEFI6	Differentially expressed in FDCP 6 homolog	29,611	7,75E-06	5,111	1,12E-03
SMAD3; SMAD5; SMAD1; SMAD2; SMAD9	Mothers against decapentaplegic homolog 3; Mothers against decapentaplegic homolog 5; Mothers against decapentaplegic homolog 1; Mothers against decapentaplegic homolog 2; Mothers against decapentaplegic homolog 9	29,375	8,00E-06	5,097	1,12E-03
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	27,882	9,84E-06	5,007	1,15E-03
DKC1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1	27,850	9,89E-06	5,005	1,15E-03
DCTN2	Dynactin subunit 2	27,674	1,01E-05	4,994	1,15E-03
TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	27,669	1,01E-05	4,994	1,15E-03
EIF3H	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	25,945	1,31E-05	4,882	1,41E-03
MTND	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	25,713	1,36E-05	4,867	1,41E-03
AQR	RNA helicase aquarius	24,715	1,59E-05	4,798	1,58E-03
CMBL	Carboxymethylenebutenolidase homolog	23,785	1,85E-05	4,732	1,67E-03
OXSRI	Serine/threonine-protein kinase OSR1	23,503	1,94E-05	4,712	1,67E-03
CCZ1; CCZ1B	Vacuolar fusion protein CCZ1 homolog; Vacuolar fusion protein CCZ1 homolog B	23,227	2,04E-05	4,691	1,67E-03
MET	Hepatocyte growth factor receptor	23,003	2,12E-05	4,674	1,67E-03
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	22,901	2,15E-05	4,667	1,67E-03
RGPD4; RGPD3; RGPD1; RGPD2; RGPD5; RGPD8	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 4; RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 3; RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 1; RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 2; RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 5; RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 8	22,863	2,17E-05	4,664	1,67E-03
CSTF2	Cleavage stimulation factor subunit 2	22,852	2,17E-05	4,663	1,67E-03
IPO5	Importin-5	22,673	2,24E-05	4,650	1,67E-03
PA1B3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha1	22,051	2,50E-05	4,602	1,78E-03
MAP4	Microtubule-associated protein 4	21,890	2,58E-05	4,589	1,78E-03
YTHD3; YTHD1	YTH domain-containing family protein 3; YTH domain-containing family protein 1	21,827	2,61E-05	4,584	1,78E-03
KPCD	Protein kinase C delta type	21,357	2,84E-05	4,546	1,85E-03
GEPH	Gephyrin	21,326	2,86E-05	4,544	1,85E-03
CSN7A	COP9 signalosome complex subunit 7a	20,934	3,08E-05	4,512	1,94E-03
AR6P4	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	20,082	3,63E-05	4,440	2,19E-03

Tabela 4 – Proteoma Diferencialmente Expresso em SEVh ($p < 0,01$) (continuação)

Código	Nome da proteína (em inglês)	t.stat	p value	$-\log_{10}(p)$	FDR
AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	20,036	3,66E-05	4,436	2,19E-03
CO5A1	Collagen alpha-1(V) chain	19,801	3,84E-05	4,416	2,24E-03
RS2	40S ribosomal protein S2	19,162	4,37E-05	4,359	2,49E-03
ANFY1	Rabankyrin-5	18,862	4,65E-05	4,332	2,54E-03
SCFD1	Sec1 family domain-containing protein 1	18,843	4,67E-05	4,331	2,54E-03
CHD1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	18,682	4,83E-05	4,316	2,54E-03
MET25	Probable methyltransferase-like protein 25	18,622	4,89E-05	4,310	2,54E-03
EI2BD	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	18,212	5,35E-05	4,272	2,72E-03
GALT2	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	18,063	5,52E-05	4,258	2,75E-03
CUTA	Protein CutA	17,857	5,78E-05	4,238	2,82E-03
RLA2	60S acidic ribosomal protein P2	17,691	6,00E-05	4,222	2,87E-03
RIR2	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	17,556	6,18E-05	4,209	2,90E-03
AP2S1	AP-2 complex subunit sigma	17,469	6,31E-05	4,200	2,90E-03
KITH	Thymidine kinase, cytosolic	17,357	6,47E-05	4,189	2,92E-03
GFPT2	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 2	17,203	6,70E-05	4,174	2,96E-03
MYLK	Myosin light chain kinase, smooth muscle	17,074	6,90E-05	4,161	3,00E-03
TNS2; TENS3; TENS1	Tensin-2; Tensin-3; Tensin-1	16,846	7,28E-05	4,138	3,11E-03
VPS36	Vacuolar protein-sorting-associated protein 36	16,482	7,94E-05	4,100	3,27E-03
PAF1	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	16,479	7,94E-05	4,100	3,27E-03
PALLD	Palladin	16,321	8,25E-05	4,084	3,34E-03
IF4G2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	16,113	8,68E-05	4,062	3,46E-03
FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase	15,836	9,29E-05	4,032	3,52E-03
ARL1	ADP-ribosylation factor-like protein 1	15,821	9,33E-05	4,030	3,52E-03
SYMC	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	15,788	9,40E-05	4,027	3,52E-03
SATT	Neutral amino acid transporter A	15,774	9,44E-05	4,025	3,52E-03
OGFR	Opioid growth factor receptor	15,662	9,71E-05	4,013	3,57E-03
RAB1B	Ras-related protein Rab-1B	15,602	9,85E-05	4,006	3,57E-03
CSN5	COP9 signalosome complex subunit 5	15,515	1,01E-04	3,997	3,59E-03
RRAGA; RRAGB	Ras-related GTP-binding protein A; Ras-related GTP-binding protein B	15,436	1,03E-04	3,988	3,61E-03
FXR2	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	15,097	1,12E-04	3,950	3,89E-03
EXOS3	Exosome complex component RRP40	15,027	1,14E-04	3,942	3,90E-03
RB27A	Ras-related protein Rab-27A	14,831	1,20E-04	3,920	4,05E-03
CRLD1	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 1	14,651	1,26E-04	3,899	4,09E-03
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	14,641	1,27E-04	3,898	4,09E-03
ZNT7	Zinc transporter 7	14,639	1,27E-04	3,897	4,09E-03
LANC1	Glutathione S-transferase LANCL1	14,513	1,31E-04	3,883	4,14E-03

Tabela 4 – Proteoma Diferencialmente Expresso em SEVh ($p < 0,01$) (continuação)

Código	Nome da proteína (em inglês)	t.stat	p value	- log₁₀(p)	FDR
AP1G1	AP-1 complex subunit gamma-1	14,497	1,32E-04	3,881	4,14E-03
GAPD1	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	14,033	1,50E-04	3,825	4,64E-03
ARHG1	Rho guanine nucleotide exchange factor 18	13,628	1,68E-04	3,775	5,08E-03
IFRD2	Interferon-related developmental regulator 2	13,626	1,68E-04	3,775	5,08E-03
IF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	13,450	1,77E-04	3,753	5,28E-03
FERM1	Fermitin family homolog 1	13,217	1,89E-04	3,723	5,59E-03
ARGL1	Arginine and glutamate-rich protein 1	13,099	1,96E-04	3,708	5,72E-03
KCC2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	13,026	2,00E-04	3,698	5,74E-03
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	13,005	2,02E-04	3,695	5,74E-03
RBM25	RNA-binding protein 25	12,929	2,06E-04	3,685	5,76E-03
SEC13	Protein SEC13 homolog	12,896	2,08E-04	3,681	5,76E-03
SART3	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	12,877	2,10E-04	3,678	5,76E-03
CK098	Uncharacterized protein C11orf98	12,827	2,13E-04	3,672	5,78E-03
AP1B1	AP-1 complex subunit beta-1	12,759	2,17E-04	3,663	5,83E-03
PR38B	Pre-mRNA-splicing factor 38B	12,707	2,21E-04	3,656	5,83E-03
PHF5A	PHD finger-like domain-containing protein 5A	12,690	2,22E-04	3,654	5,83E-03
CAPR1	Caprin-1	12,606	2,28E-04	3,642	5,88E-03
NOP16	Nucleolar protein 16	12,593	2,29E-04	3,640	5,88E-03
TBC15	TBC1 domain family member 15	12,388	2,44E-04	3,613	6,21E-03
PGTB2	Geranylgeranyl transferase type-2 subunit beta	12,319	2,49E-04	3,603	6,28E-03
PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1	12,096	2,68E-04	3,572	6,53E-03
IF2B2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	12,091	2,68E-04	3,571	6,53E-03
GCP60	Golgi resident protein GCP60	12,051	2,72E-04	3,566	6,53E-03
SHSA4	Protein shisa-4	12,038	2,73E-04	3,564	6,53E-03
ARF6	ADP-ribosylation factor 6	12,037	2,73E-04	3,564	6,53E-03
TCTP	Translationally-controlled tumor protein	11,969	2,79E-04	3,554	6,59E-03
RFC2	Replication factor C subunit 2	11,934	2,82E-04	3,549	6,59E-03
SHC1; SHC2	SHC-transforming protein 1; SHC-transforming protein 2	11,898	2,86E-04	3,544	6,59E-03
CPSF1	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	11,890	2,87E-04	3,543	6,59E-03
UBP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like	11,724	3,03E-04	3,519	6,89E-03
PDLI1	PDZ and LIM domain protein 1	11,656	3,10E-04	3,509	6,98E-03
WDR11	WD repeat-containing protein 11	11,589	3,17E-04	3,499	7,07E-03
AP2A2	AP-2 complex subunit alpha-2	11,453	3,32E-04	3,479	7,30E-03
MARE1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	11,443	3,33E-04	3,478	7,30E-03
SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	11,380	3,40E-04	3,469	7,39E-03
ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	11,355	3,43E-04	3,465	7,39E-03
CDC16	Cell division cycle protein 16 homolog	11,224	3,59E-04	3,445	7,66E-03

Tabela 4 – Proteoma Diferencialmente Expresso em SEVh ($p < 0,01$) (continuação)

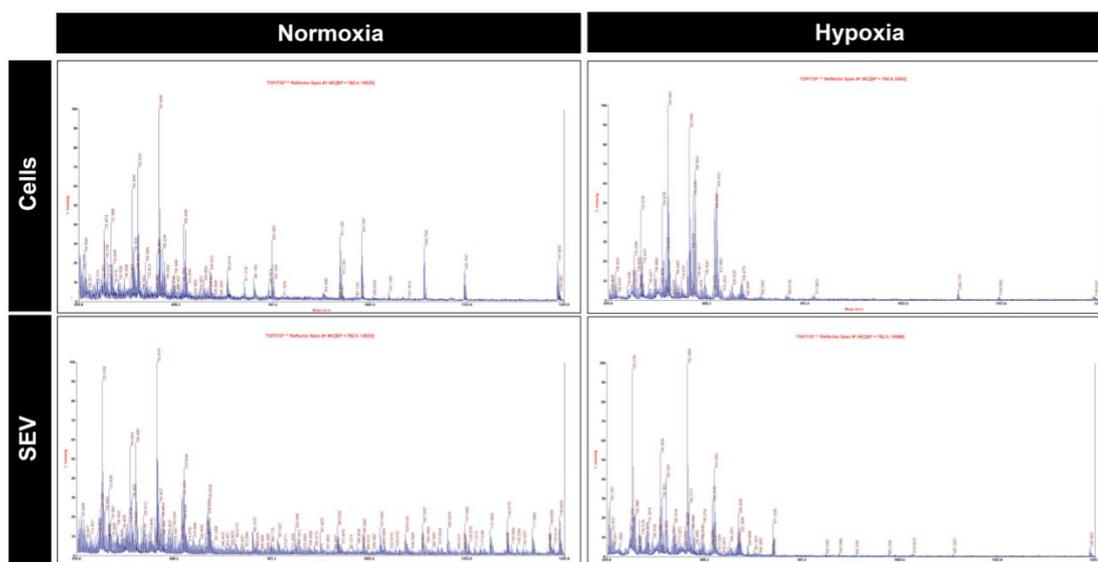
Código	Nome da proteína (em inglês)	t.stat	p value	- log₁₀(p)	FDR
LARP1	La-related protein 1	11,179	3,65E-04	3,438	7,71E-03
B4GA1	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1	11,009	3,87E-04	3,412	7,99E-03
PIP	Prolactin-inducible protein	11,006	3,87E-04	3,412	7,99E-03
S12A4	Solute carrier family 12 member 4	10,979	3,91E-04	3,408	7,99E-03
TBB2A	Tubulin beta-2A chain	10,933	3,98E-04	3,401	7,99E-03
KLC2	Kinesin light chain 2	10,929	3,98E-04	3,400	7,99E-03
ABC3C	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C	10,926	3,98E-04	3,400	7,99E-03
SPY4	Protein sprouty homolog 4	10,907	4,01E-04	3,397	7,99E-03
SREK1	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	10,861	4,08E-04	3,389	7,99E-03
EMP3	Epithelial membrane protein 3	10,833	4,12E-04	3,385	7,99E-03
SYT1; SYT2	Extended synaptotagmin-1; Extended synaptotagmin-2	10,816	4,14E-04	3,383	7,99E-03
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	10,816	4,15E-04	3,382	7,99E-03
CC124	Coiled-coil domain-containing protein 124	10,711	4,31E-04	3,366	8,23E-03
TF65	Transcription factor p65	10,670	4,37E-04	3,360	8,29E-03
EXOC1	Exocyst complex component 1	10,626	4,44E-04	3,353	8,36E-03
SAR1A	GTP-binding protein SAR1a	10,588	4,50E-04	3,347	8,41E-03
PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	10,510	4,63E-04	3,334	8,59E-03
STAM1	Signal transducing adapter molecule 1	10,476	4,69E-04	3,329	8,63E-03
RS3	40S ribosomal protein S3	10,453	4,73E-04	3,325	8,64E-03
BABA2	BRISC and BRCA1-A complex member 2	10,410	4,81E-04	3,318	8,71E-03
SC16A	Protein transport protein Sec16A	10,377	4,87E-04	3,313	8,74E-03
LYSC	Lysozyme C	10,360	4,90E-04	3,310	8,74E-03
RUXE	Small nuclear ribonucleoprotein E	10,239	5,13E-04	3,290	9,08E-03
ARF4	ADP-ribosylation factor 4	10,203	5,20E-04	3,284	9,11E-03
CAZA2	F-actin-capping protein subunit alpha-2	10,192	5,22E-04	3,282	9,11E-03
SPY2	Protein sprouty homolog 2	10,154	5,30E-04	3,276	9,17E-03
PURB	Transcriptional activator protein Pur-beta	10,134	5,34E-04	3,273	9,18E-03
EIF1; EIF1B	Eukaryotic translation initiation factor 1; Eukaryotic translation initiation factor 1b	10,096	5,42E-04	3,266	9,20E-03
DEK	Protein DEK	10,090	5,43E-04	3,265	9,20E-03
ABCF2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	10,011	5,60E-04	3,252	9,42E-03
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase	9,956	5,72E-04	3,243	9,55E-03
DC1L2	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	9,930	5,78E-04	3,238	9,59E-03
UCK2	Uridine-cytidine kinase 2	9,912	5,82E-04	3,235	9,59E-03

FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

3.4.3 Padronização para Análise Lipidômica de EVs

A padronização do protocolo de extração de lipídios de EVs foi realizada com o intuito de adaptar o protocolo de (Bligh; Dyer, 1959). Utilizando amostras de lipídios extraídos de células MDA-MB-231 e SEV, verificamos que os perfis dos espectros do MALDI-TOF/TOF obtidos em cada condição é distinto e segue padrões similares entre amostras de células e EVs, mas diverge entre amostras hipóxicas e normóxicas (Figura 13). Apesar dos resultados preliminares serem animadores, dificuldades técnicas incluindo escassez de amostras, manutenção de equipamentos e a pandemia de COVID-19 impediram a realização da análise lipidômica.

Figura 13 – Espectros da Padronização da Lipidômica por MALDI-TOF/TOF



Espectros de amostras-teste de células MDA-MB-231 e EVs tumorais, coletadas em normóxia e hipóxia, para avaliação de lipídios. FONTE: Bianca C. Pachane & Thais R. Cataldi (2019).

3.4.4 Padronização para Análise Metabolômica de EVs

A extração de metabólitos e metabolômica de EVs foi padronizada a partir de uma amostra de SEVh, a fim de determinar a concentração adequada de EVs para o procedimento e a eficácia do protocolo vigente neste tipo de material. A amostra de SEVh foi separada a partir de 5 frascos T150, com $1,24 \times 10^6$ células cada (contadas ao final da coleta), e viabilidade média de 92%. Por NTA, verificamos que a amostra continha $2,77 \times 10^{11}$ partículas/ml, e diâmetro médio de 135,6 nm. O perfil de

metabólitos obtido dessa amostra aproximou-se muito do observado no controle branco, o que foi indicativo de escassez amostral (Tabela 5). As análises de enriquecimento e rede neural desses metabólitos foram inconclusivas. Devido a problemas técnicos envolvendo a interdição do laboratório para reforma e a impossibilidade de preparo das amostras de EVh, a metabolômica não foi realizada devido à baixa quantidade amostral.

Tabela 5 – Metabólitos de SEVh (n=1)

Nome do Metabólito (em inglês)	Fold-change
Alanine, N-methyl-N-methoxycarbonyl-, hexyl ester	186,117
Glucopyranose	71,408
Glucose	63,013
5-Oxoproline	44,827
Sucrose	17,245
Tolycaine	12,320
Isoleucine	9,757
Valine	8,233
Proline	6,818
Threonine	5,499
Allofuranose	4,775
Stearic acid	4,421
Glyceric acid	3,418
Quinacetophenone	2,652
Serine	2,628
Psicofuranose	2,588
Ephedrine	2,560
Inositol	2,495
Sorbitol	2,347
Phthalic acid, isobutyl 4-octyl ester	2,169
1,2,3-Trichlorobenzene	1,723
Lysine	1,460
Phenylalanine	1,373
Cyclohexane-1,3,5-trione	1,110
Erythronic acid	0,892
Mono-2-ethylhexyl phthalate	0,591
Inositol 6-phosphate	0,560
Glucitol	0,306

FONTE: Bianca C. Pachane & Thais R. Cataldi, 2024.

3.5 DISCUSSÃO

A caracterização de EVs para estudos aprofundados de sua função e ação efetora é necessária para distinguir as características determinísticas da amostra, o que facilita em sua reproducibilidade (Couch *et al.*, 2021). Neste capítulo, investigamos as particularidades das EVs utilizadas nos próximos capítulos, demonstrando seu papel potencial na invasão celular. A separação de diferentes tipos de EV do meio de cultura de células foi utilizada para a caracterização das diferentes populações, visto que EVs variam em tamanho, composição, densidade e outras características determinísticas (Mathieu *et al.*, 2019). Preparações puras de EV são extremamente difíceis de obter, especialmente devido às limitações das técnicas de separação, o que torna sua caracterização necessária (Théry *et al.*, 2018; van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018; Welsh *et al.*, 2024).

O método de ultracentrifugação utilizado foi otimizado de um protocolo pré-estabelecido (Théry *et al.*, 2006) e apresenta limitações técnicas, como a possibilidade de co-isolamento de agregados proteicos, microdomínios lipídicos e outras partículas (Brennan *et al.*, 2020). Para evitar contaminações exógenas importantes, como as provenientes do FBS, realizamos sua ultracentrifugação prévia aos isolamentos (Van Deun *et al.*, 2017). Recentemente, atualizamos o protocolo para adicionar uma etapa de filtração antes da lavagem do *pellet* da centrifugação a 150,000 x *g*, visando melhorar os preparos para ensaios celulares, com resultados satisfatórios.

O uso de um método de alta retenção e baixa especificidade como a ultracentrifugação diferencial foi escolhido devido à necessidade de grandes quantidades amostrais para os ensaios de ômicas que foram realizados (Couch *et al.*, 2021). Outros métodos complementares, como o gradiente de densidade (DG), foram estudados para serem aplicados mas tornaram-se inviáveis: ao melhorar a pureza das amostras de EV, este método extremamente longo e especializado apresenta baixa retenção e grande risco de perda das amostras durante as etapas de lavagem (Clos-Sansalvador *et al.*, 2022). No momento de estabelecimento do protocolo de separação, equipamentos de ultrafiltração ainda não estavam disponíveis para compra direta no país e as técnicas mais utilizadas hoje, como SEC, ainda estavam em desenvolvimento comercial. Contudo, mesmo utilizando uma técnica de alta retenção amostral, a quantidade isolada nas preparações de EV não foi o suficiente para análises lipidômica e metabolômica e precisaria ser escalonada.

Apesar das limitações do preparo, obtivemos o proteoma comparativo de SEVh e SEVn, onde verificamos que a proteína mais significativamente expressa de SEVh é ISG15, uma ubiquitina-símile ligada anteriormente à invasão celular mediada por integrinas (Hermann *et al.*, 2016). Outras proteínas importantes incluem mTOR e seu regulador, RPTOR, que são críticas para o controle do metabolismo do câncer (Mossmann; Park; Hall, 2018). Proteínas estruturais, como as proteínas associadas aos microtúbulos 1B, 4 e RB, também estão enriquecidas em SEVh. As duas famílias detectadas em SEVh, SMAD e RGDP, são responsáveis pela ativação da via do TGF- β e da atividade GTPase nos poros nucleares, respectivamente (Derynck; Zhang, 2003; Gaudet *et al.*, 2011).

O proteoma de EVs derivadas de MDA-MB-231 foi caracterizado previamente (Palazzolo *et al.*, 2012), mas este foi o primeiro trabalho que demonstrou a caracterização aprofundada de SEV isoladas de MDA-MB-231 a 1% O₂ e comparou sua composição à SEV separadas de células sob condições normais de cultivo. A seguir, a população de EVs aqui descrita foi utilizada para avaliação da atividade efetora de SEV em células tumorais de mama (ver Capítulo 4) e no microambiente tumoral (ver Capítulo 5).

3.6 CONCLUSÃO

SEV isoladas de células MDA-MB-231 em duas condições de oxigenação (1% e 20% O₂) apresentam características similares referente aos biomarcadores vesiculares, tamanho e morfologia, mas diferem em abundância de partículas e proteínas. SEVh são mais enriquecidas que SEVn, apresentando proteínas específicas para vias pró-tumorais, incluindo invasão celular e angiogênese. Nossos resultados sugerem o potencial pró-tumoral de SEVh.

CAPÍTULO 4 – INVASÃO TUMORAL MEDIADA POR VESÍCULAS EXTRACELULARES HIPÓXICAS NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

4.1 INTRODUÇÃO

4.2.1 Microambiente Tumoral

A carcinogênese determina a criação de um microambiente tumoral (TME), no qual células neoplásicas, estromais, endoteliais e imunes modificam o ambiente do tecido tumoral de forma a favorecer sua sobrevivência (Amos; Choi, 2021). Dentre suas características, que serão abordadas no Capítulo 5, o TME também é caracterizado pela perda da homeostase da matriz extracelular (ECM) através de alterações em sua deposição, remodelamento e reticulação em função da presença do tumor (Amos; Choi, 2021; Hanahan; Weinberg, 2011). A ECM é composta por mais de 300 proteínas, proteoglicanos e glicoproteínas e organizada como membrana basal ou tecido intersticial, permeando os tecidos e fornecendo-lhes estruturação (Bonnans; Chou; Werb, 2014). Sua remodelação é realizada através de serinoproteases e metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas que coletivamente conseguem clivar todos os componentes matriciais conhecidos (Bonnans; Chou; Werb, 2014; Overall; López-Otín, 2002; Winkler *et al.*, 2020).

A deposição de colágenos fibrilares e degradação da ECM por MMPs, feita majoritariamente por CAFs, propicia o enrijecimento da matriz e a criação de regiões de ancoragem das células para motilidade (Amos; Choi, 2021). A dinâmica de adesão de células à componentes matriciais, especialmente por integrinas, varia conforme a rigidez e composição da ECM (Kanchanawong; Calderwood, 2023). Integrinas são receptores heterodiméricos de membrana que apresentam um domínio transmembrana conectando a porção globular extracelular, que interage com componentes da ECM, e a cauda citoplasmática, conectada ao citoesqueleto de actina (Hamidi; Ivaska, 2018). A expressão de integrinas é alterada no câncer dependendo de sua localização, estágio da progressão metastática e sinalização, podendo ser modificado durante tratamentos quimioterápicos (Hamidi; Ivaska, 2018; Pachane;

Selistre-de-Araujo, 2024). Uma revisão abrangente do papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ na resistência à quimioterapia foi publicada recentemente pela autora (Anexo C).

4.2.2 Cascata Metastática

Inicialmente, o desenvolvimento de tumores ocorre a partir da divisão clonal das células, o que aumenta a massa cancerosa exponencialmente (Quail; Joyce, 2013). Essa proliferação celular sustentada gera escassez de nutrientes e oxigênio, iniciando uma pressão seletiva no tecido e propiciando a diferenciação das células em fenótipos heterogêneos (Welch; Hurst, 2019). Populações de células que apresentam alta agressividade e propensão à motilidade podem levar a doença à seu próximo estágio, denominado metástase (Figura 14) (Quail; Joyce, 2013; Welch; Hurst, 2019).

Figura 14 – Etapas Principais da Cascata Metastática

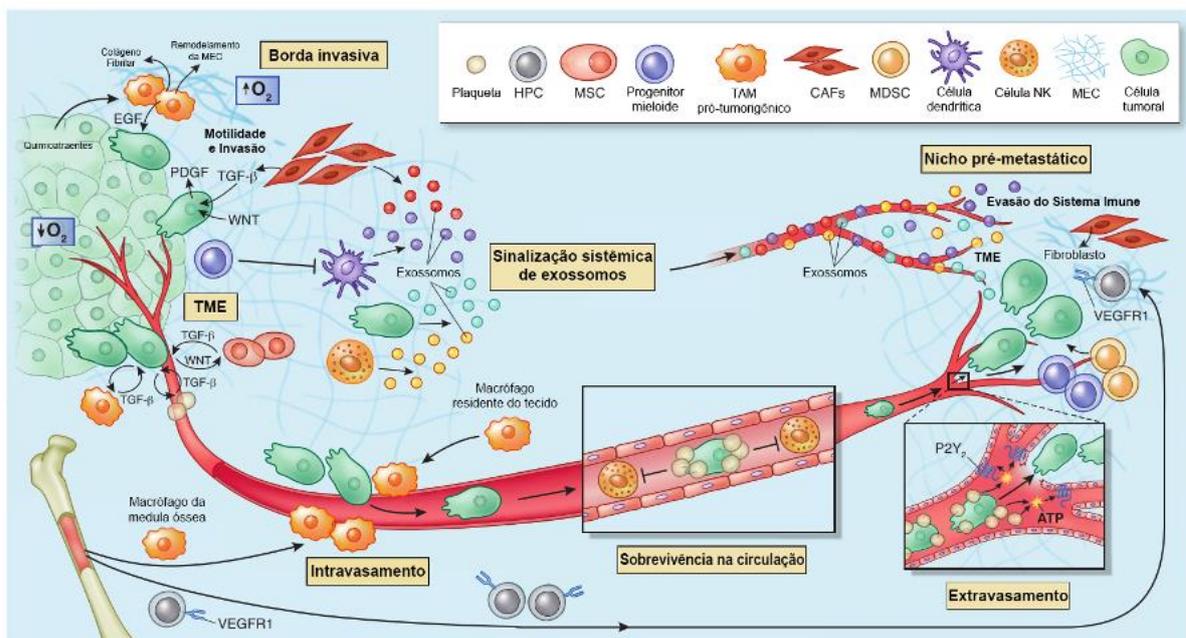


Diagrama traduzido das etapas concomitantes e complementares da metástase tumoral.
FONTE: Quail *et al.*, 2013.

A metástase é um processo multifatorial que culmina na formação de novos sítios de desenvolvimento tumoral distantes do sítio primário, e é a principal causa de óbitos por câncer em humanos (Siegel *et al.*, 2023; Welch; Hurst, 2019). A cascata de reações celulares pró-metastáticas repercute em todo o tecido tumoral, envolvendo as células neoplásicas, células associadas ao tumor, ECM e outros componentes

extracelulares solúveis (Amos; Choi, 2021). A convenção vigente determina que o aumento da rigidez da ECM é o sinal promotor da primeira etapa da metástase, que consiste na invasão celular da membrana basal (Najafi; Farhood; Mortezaee, 2019). Em seguida, as células tumorais invadem tecidos adjacentes, podendo adentrar a corrente sanguínea e linfática por intravasamento. Após um breve período de sobrevivência na circulação, as células podem extravasar e colonizar um novo sítio (Quail; Joyce, 2013; Welch; Hurst, 2019).

A clivagem da ECM por MMPs fragmenta seus componentes, gerando sítios de ligação para integrinas que, devido a sua associação às fibras de actina, ativam a polarização do citoesqueleto (Hamidi; Ivaska, 2018; Winkler *et al.*, 2020). A modificação do citoesqueleto interfere no metabolismo celular, inibindo componentes epiteliais que participam em adesões intercelulares e ativando marcadores mesenquimais, que modificam o fenótipo celular para facilitar a motilidade (Ramesh; Brabletz; Ceppi, 2020). A expressão de integrinas é modificada para facilitar a motilidade celular, gerando pontos de adesão focal que ancoram as células de forma efêmera à ECM, seguida do tracionamento do corpo celular (Hamidi; Ivaska, 2018). Os pontos de adesão focal podem se desenvolver no ápice de invadopódios, estruturas ricas em actina e tubulina protraídas do citoplasma de onde MMPs são secretadas via EVs (Hoshino *et al.*, 2013; Shimoda, 2019). As EVs secretadas na porção apical das células migratórias podem criar trilhos na matriz, facilitando a movimentação das células pela superfície fibrosa (Sung *et al.*, 2020).

A migração ativa auxiliada por moléculas adesivas, enzimas proteolíticas e componentes do citoesqueleto consiste na invasão celular, que é iniciada a partir da clivagem da membrana basal do tecido tumoral (Steeg, 2016). A invasão celular é o processo que leva as células do tumor a penetrar por outros tecidos, podendo se espalhar pelo corpo pela circulação sanguínea (mediante intravasamento e extravasamento, ou migração via pericitos), pelos vasos linfáticos, ou pelos nervos (Welch; Hurst, 2019). A hipóxia é um dos fatores que promove a invasão em TNBC, mas a contribuição de EVs hipóxicas neste processo ainda é pouco conhecida (Srivastava *et al.*, 2023). Neste capítulo, demonstramos que EVs hipóxicas são capazes de promover o fenótipo invasivo de uma linhagem de TNBC em condições normais de oxigênio, gerando alterações no proteoma celular que favorecem este processo. Os resultados aqui descritos foram publicados previamente (Pachane *et al.*, 2022) (Anexo B).

4.2 OBJETIVOS

Verificar a contribuição de gelatinases carregadas por vesículas extracelulares tumorais na invasão de células tumorais de mama, em situações de hipóxia e normóxia.

4.2.1 Objetivos específicos

- Validar a presença de MMP-2 e MMP-9 em SEV de células MDA-MB-231 em hipóxia por meio de técnicas bioquímicas;
- Verificar alterações na atividade de MMP-2 e MMP-9 vesiculares sob influência da hipóxia e da normóxia;
- Estudar a influência de SEVs na capacidade invasiva de células tumorais em normóxia e hipóxia.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos descritos no Capítulo 3 também foram utilizados neste capítulo, acrescentado dos métodos a seguir.

4.3.1 Desenho Experimental

Dois grupos de células MDA-MB-231, cultivadas conforme descrito no item 3.3.1, foram semeadas na concentração de 3×10^5 células/ml em triplicatas nas placas de 6 poços contendo 3 ml de meio de plaqueamento. As células foram incubadas por 24 h em hipóxia (1% O₂) ou normóxia (~20% O₂) para adesão. O meio foi substituído em condições estéreis para meio de plaqueamento contendo 5 µg/ml de SEVs hipóxicas (i.e., grupo SEVh, preparados conforme descrito no item 3.3.2) ou PBS (i.e., grupo controle não-tratado). Após 24 h de tratamento, o meio condicionado e/ou células aderidas foram coletados conforme os experimentos detalhados a seguir.

4.3.2 Western Blotting Quantitativo

Amostras preparadas conforme o desenho experimental (ver 4.3.1) dos quatro grupos de interesse foram coletadas em três dias diferentes, utilizando células com passagens distintas, e tratadas com o mesmo lote de SEVh. As células aderidas foram lavadas com PBS e coletadas sob gelo em PBS gelado mediante raspagem mecânica. Após centrifugação a 7.800 rpm por 12 minutos, 4 °C, o precipitado celular foi ressuspendido em tampão RIPA e incubado por 2 horas no gelo, sendo vortexado por 10 segundos a cada 15 minutos. O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C para remoção de resíduos, transferido para novo tubo e quantificado por método BCA (ver 2.3.3.1).

As três amostras de cada grupo foram aplicadas em um mesmo gel, e cada gel foi repetido em três momentos distintos, conforme descrito previamente (ver 3.3.5). Avaliamos a expressão proteica de HIF1A, ITGB1, ITGB3, MMP2 e MMP9, e selecionamos a proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle constitutivo (Tabela 6).

Para quantificação da expressão proteica, a membrana exposta ao anticorpo para proteína-alvo foi sujeitada também ao anti-GAPDH, e utilizamos de

duas estratégias devido a limitações experimentais: (1) a membrana foi cortada com um bisturi em duas partes, que foram remontadas para revelação simultânea dos dois anticorpos, ou (2) a membrana foi sondada para a proteína de interesse e submetida à *stripping* para investigação da proteína *housekeeping*. Para *stripping*, a membrana foi mantida em agitação para duas lavagens de 5 minutos com tampão (glicina, SDS 0,1% e Tween® 20 1%, pH 2,2), seguida de duas lavagens de 10 minutos com PBS, e duas lavagens de 5 minutos com TBST.

Tabela 6 – Anticorpos Primários Utilizados para *Western Blotting* Quantitativo

Alvo	Diluição	Fabricante	Código
GAPDH	1:10.000	Abcam	181602
HIF-1 α	1:1.000	Abcam	41608
Integrina β 1	1:1.000	Abcam	179471
Integrina β 3	1:1.000	Abcam	119992
MMP-2	1:1.000	Abcam	92536
MMP-9	1:1.000	Abcam	38898

FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

As bandas detectadas na revelação das membranas foram analisadas por densitometria, utilizando o software FIJI (Image J) (Schindelin *et al.*, 2012). Regiões de interesse contendo a banda íntegra foram selecionadas e a intensidade de pixels foi mensurada após remoção do ruído (*background*). A intensidade de pixels da proteína-alvo foi dividida pela intensidade de pixels do GAPDH do mesmo poço, e os valores processados foram submetidos à análise estatística (ver 4.3.9).

4.3.3 Ensaios de Invasão Celular *in vitro*

4.3.3.1 Invasão em Câmara de Boyden com Matrigel

Câmaras de invasão foram montadas com insertos (poros 8,0 μ m, Greiner) e placas de 24 poços. No gelo, uma fina camada de *Matrigel Matrix Basement Membrane* (#356234, Corning) foi diluído (1:1, v/v) em tampão (NaCl [0,7%] e Tris [0,01 M]) e aplicada no centro dos insertos. O aparato foi incubado por 2 horas a 37 °C para estabelecimento do *coating*, e a matriz foi condicionada com meio DMEM depletado de soro e glicose por 30 minutos a 37 °C antes do início do experimento.

Células MDA-MB-231 foram resuspendidas em DMEM depletado de soro e glicose e aliquotadas (10^5 células) em microtubos individualizados para tratamento com SEVh (5 $\mu\text{g/ml}$) ou PBS (controle positivo). O conteúdo dos microtubos foi adicionado ao compartimento superior do inserto, que foi imerso na câmara inferior contendo DMEM 10% FBS. Como controle negativo de invasão, insertos contendo células não-tratadas foram imersos em DMEM sem soro. A invasão foi proporcionada por 6 e 16 horas, em atmosfera normóxica (20% O_2) ou hipóxica (1% O_2), a 37 °C, 5% CO_2 . Após remoção do meio dentro dos insertos, as membranas foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos, em temperatura ambiente. Os insertos foram lavados em PBS e, utilizando um *swab*, removemos o excesso de células e matriz da porção superior das membranas. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (0,7 $\text{ng}/\mu\text{l}$) por 10 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. Após lavagem em PBS, os insertos foram secos com *swab*, destacados com bisturi e montados em lâminas histológicas.

A análise por *high content screening* foi realizada em microscópio de epifluorescência (*ImageXpress Micro XLS+*, Molecular Devices), sob aumento de 10x. Imagens adquiridas da área total dos insertos foram utilizadas para contagem automatizada de núcleos, com máscara criada no *software MetaXpress* (Molecular Devices). A contagem de todos os sítios de cada poço foi somada, gerando um valor que foi normalizado pela média do controle negativo de invasão. O índice de invasão foi obtido mediante divisão dos valores normalizados de cada poço pela média dos controles positivos de invasão.

4.3.3.2 Ensaio de Degradação de Gelatina Fluorescente

Lamínulas de borossilicato circulares com 13 mm de diâmetro previamente lavadas com etanol 70% foram recobertas com poli-L-lisina (PLL, 100 $\mu\text{g/ml}$) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, as lamínulas foram imersas em glutaraldeído 0,5% gelado por 15 minutos, no escuro, para realização de reticulação (*cross-link*). Uma fina camada de gelatina conjugada com fluoresceína, diluída a 0,2 mg/ml (G13187, Molecular Probes), foi disposta nas lamínulas com auxílio de *Parafilm M* (Amcor) por 16-18 horas a 4 °C (Even-Ram; Artym, 2009). Para semeadura das células, as lamínulas foram inseridas em placas de 24 poços, lavadas

duas vezes com PBS estéril e condicionadas com DMEM sem soro por 30 minutos a 37 °C.

Células MDA-MB-231 foram resuspendidas em DMEM depletado de soro e aliqüotadas (5×10^4 células/ml) em microtubos individualizados para tratamento com SEVh (5 µg/ml) ou PBS (controle negativo). Como controle positivo, células não-tratadas foram imersas em DMEM 10% FBS. O conteúdo dos microtubos foi cuidadosamente semeado nos poços contendo as lamínulas e incubado, em normóxia (~20% O₂) ou hipóxia (1% O₂), por 24 e 48 horas a 37 °C, 5% CO₂. O meio condicionado foi coletado para realização de zimografia em gelatina (ver 3.3.4).

As células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos, em temperatura ambiente, e lavados duas vezes com PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS e bloqueadas com BSA-PBS 1% por 1 hora a 4 °C. A marcação do citoesqueleto por tubulina foi realizada mediante exposição de anticorpo primário diluído em BSA-PBS 1% (5 µg/ml, #80779 Abcam) por 18 horas a 4 °C. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com *Alexa Fluor® 647* (1 µg/ml, #150115 Abcam) por 1 hora, no escuro e em temperatura ambiente. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (0,7 ng/µl) por 10 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. Após três lavagem em PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas histológicas com meio *ProLong™ Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen) e seladas com esmalte.

As lâminas foram avaliadas por *high content screening* em microscópio de epifluorescência (*ImageXpress Micro XLS+*, Molecular Devices), sob aumento de 20x. Imagens de sítios aleatórios foram adquiridas no *software MetaXpress* (Molecular Devices) para quantificação da área degradada, determinada no software FIJI (ImageJ). Para tal, foi utilizada a imagem binária do filtro FITC, com *threshold* personalizado para remover o ruído do *coating*. Os resultados de três ensaios realizados em dias diferentes, com o mesmo lote de SEVh porém passagens celulares distintas, foi avaliado como a área total de degradação da gelatina na imagem, normalizada pela contagem de núcleos na imagem.

4.3.4 Zimografia em Gelatina

O sobrenadante do ensaio de degradação de gelatina fluorescente (ver 4.3.3.2) foi coletado e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C, A fase líquida foi concentrada no equipamento *Concentrator Plus* (Eppendorf) e quantificada por BCA (ver 2.3.3.1),

O ensaio de zimografia seguiu uma metodologia adaptada (Leber; Balkwill, 1997). Amostras de sobrenadante (20 µg) e EVs (10 µg) foram tratadas com coquetel de inibidor de proteases (10%, v/v), misturadas a tampão Laemlli não-redutor (10% SDS; glicerol; 0,1 M EDTA; 1 M Tris-HCl pH 6,8; *bromophenol blue*) na proporção 2:1 (v/v) e aplicadas em géis SDS-PAGE 10% com gelatina (100 mg/ml). Utilizamos o padrão proteico *Precision Plus Protein™ Dual Color* (Bio-Rad) como controle de aplicação, e uma amostra padrão foi aplicada em todos os géis para fins de normalização. Devido às limitações do método, cada amostra foi aplicada em dois géis distintos, que foram corridos ao mesmo tempo.

As proteínas foram separadas por eletroforese a 80 V, 4 °C, com duração média de 4 horas. Os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% por 40 minutos em temperatura ambiente e incubados em tampão de renaturação (Tris 50 mM, cloreto de cálcio 5 mM [pH 8,0], azida sódica a 0,02% e cloreto de zinco 10 mM) por 20 horas a 37 °C. A coloração dos géis ocorreu por 24 horas em temperatura ambiente, em corante *Coomassie Brilliant Blue* (0,25% *brilliant blue*, 50% isopropanol, 10% ácido acético), seguida de descoloração em solução ácido acético:metanol:água (1:1:8, v/v) por até 48 horas.

Os géis foram escaneados em fotodocumentador *ChemIDoc™ XRS+* (Bio-Rad) e analisados pelo programa *ImageLab* (Bio-Rad). As bandas descoradas, indicativos da degradação da gelatina, foram quantificadas por densitometria e a intensidade relativa das bandas foi normalizada pela amostra-padrão.

4.3.5 Expressão Gênica por RT-qPCR

4.3.5.1 Extração de RNA Total

Células preparadas conforme o desenho experimental (ver 4.3.1) foram retiradas da incubação, lavadas com PBS gelado e coletadas em reagente *TRIzol™* (Thermo Fisher Scientific) com auxílio de um *cell scraper*. As amostras foram congeladas imediatamente em -80 °C.

Para extração de RNA total, as amostras foram descongeladas, misturadas a 200 µl de clorofórmio e vortexadas por 15 segundos. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, realizamos centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, 4 °C. Verificando-se a formação trifásica das amostras, a fração translúcida superior foi coletada em novo tubo. A eles, adicionamos 500 µl de isopropanol, invertendo cuidadosamente os tubos dez vezes para misturar, e incubamos em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, 4 °C. O pellet foi lavado em 1 ml de etanol 75% e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos, 4 °C. A lavagem do pellet em etanol foi repetida uma segunda vez. Os tubos foram secos em estufa a 37 °C antes da ressuspensão dos precipitados em 10-30 µl de água ultrapura. As amostras foram quantificadas e avaliadas quanto a seu nível de pureza no espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo-Fisher Scientific). Amostras com razão 230/260 entre 2,0 e 2,2, e razão 260/280 entre 1,8 e 2,1 foram consideradas satisfatórias.

4.3.5.2 Transcrição Reversa

As amostras de RNA foram tratadas com desoxirribonuclease I (*DNase I*, Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. Alíquotas de 1 µg de RNA em 10 µl de água ultrapura foram incubadas com 1 µl de tampão DNase I por 15 minutos em temperatura ambiente. A enzima foi inativada com adição de 1 µl de EDTA e incubação por 10 minutos a 65 °C. A amostra foi mantida no gelo durante a transcrição reversa, que foi realizada com o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). A reação foi montada no gelo mediante mistura do *master mix* (tampão, dNTP, primers randômicos, transcriptase reversa e água livre de nucleases) com as amostras de RNA e posterior incubação em termociclador (T100, Bio-Rad), seguindo o programa: 10 minutos a 25 °C; 120 minutos a 37 °C; 5 minutos a 85 °C. As amostras de cDNA foram mantidas a -20 °C.

4.3.5.3 Padronização dos primers

Para padronização dos parâmetros experimentais, realizamos previamente testes de temperatura de anelamento e curvas de eficiência dos primers com uma amostra teste. A preparação das reações seguiu o protocolo de reação em cadeia da

polimerase descrito no item abaixo (ver 3.3.5.4). Para os testes de temperatura de anelamento, cada primer foi testado em triplicata para cinco diferentes temperaturas, utilizando como base a temperatura de *melting* (T_m) indicada pelo fabricante. A curva de eficiência de cada primer foi feita mediante diluição da amostra teste de 1 a 1.000 vezes, e corrida com a T_m otimizada no teste anterior.

4.3.5.4 RT-qPCR

A avaliação da expressão gênica de *HIF1A*, *ITGB1*, *ITGB3*, *MMP2* e *MMP9* foi realizada mediante RT-qPCR. Os genes *GAPDH* e *HPRT* foram utilizados como normalizadores da expressão gênica. Os *primers* utilizados neste trabalho foram desenhados com base na sequência do gene de interesse, encontrada no banco de dados *GenBank* (NCBI, NIH), e estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Especificações dos *Primers* Senso e Antisenso para RT-qPCR

Genes	Primer Senso (5' – 3')	Primer Antisenso (3'- 5')	Amplicon (pb)	T _m (°C)	Acesso nº	Empresa
<i>GAPDH</i>	ACAGTTGCCATGT AGACC	TTGAGCACAGGG TACTTTA	80	60	NM_001256799.3	Sigma
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAA ACAATGCA	GGTCCTTTTCACC AGCAAGCT	94	58	NM_000194.3	Bioneer
<i>HIF1A</i>	AAAATCTCATCCA AGAAGCC	AATGTTCCAATTC CTACTGC	168	59,7	NM_001243084.2	Sigma
<i>ITGB1</i>	ATTCCCTTTCCTC AGAAGTC	TTTTCTTCCATTTT CCCCTG	116	60,6	NM_133376.3	Sigma
<i>ITGB3</i>	CTCCGGCCAGAT GATTC	TCCTTCATGGAGT AAGACAG	104	60	NM_000212.3	Sigma
<i>MMP2</i>	AGGACCGGTTTCAT TTGGCGG	TGGCTTGGGGTA CCCTCGCT	200	68	NM_004530.4	Bioneer
<i>MMP9</i>	CGCTACCACCTC GAACTTTG	GCCATTCACGTCG TCCTTAT	196	59	NM_004994.2	Bioneer

FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada mediante mistura de 1 µl de cDNA de interesse com 2 µl de mix de primers, 2 µl de água ultrapura e 5 µl do *supermix SsoFast EvaGreen* (Bio-Rad). As amostras foram preparadas junto ao controle sem alvo (NTC), em triplicatas técnicas. As placas foram centrifugadas a 1,200 rpm por 3 min, 4 °C antes de serem incubadas no termociclador C1000 com

sistema *real time* CFX96 (Bio-Rad). A placa foi incubada por 10 minutos a 95 °C, e passou por 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 30 segundos na T_m (Tabela 7), e 30 segundos a 72 °C. Em seguida, foi realizada a curva de *melting*, com temperaturas crescentes de 65 °C a 95 °C a cada 30 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados com base nos valores do Ct (*threshold cycle*), normalizados pela média dos Ct dos genes constitutivos e quantificados com base no grupo controle (não tratado em normóxia), conforme a equação de Livak e Schmittgen - na qual a variação na expressão de cada gene é igual à $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.3.6 Avaliação da Morfologia Celular

Lamínulas de borossilicato circulares com 13 mm de diâmetro previamente lavadas com etanol 70% foram recobertas com poli-L-lisina (PLL, 100 µg/ml) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, as lamínulas foram imersas em glutaraldeído 0,5% gelado por 15 minutos, no escuro, para realização de reticulação (*cross-link*). Uma fina camada de gelatina (0,2 mg/ml) ou *Matrigel* (1:1, v/v em tampão NaCl [0,7%] e Tris [0,01 M]; Corning), foi disposta nas lamínulas com auxílio de Parafilm M (Amcors) por 16-18 horas a 4 °C. Para semeadura das células, as lamínulas foram inseridas em placas de 24 poços, lavadas duas vezes com PBS estéril e condicionadas com DMEM sem soro por 30 minutos a 37 °C.

Células MDA-MB-231 (5×10^4 células/ml) foram semeadas DMEM completo em placas de 96 poços sem matriz (#3603, Corning) ou em lamínulas recobertas com gelatina ou *Matrigel*[™] em placas de 24 poços. O tratamento com SEVh (5 µg/ml) foi realizado junto ao tratamento, e um controle não-tratado foi mantido em paralelo. As células foram incubadas por 24 e 48 horas em normóxia (~20% O₂) ou hipóxia (1% O₂), a 37 °C, 5% CO₂.

Após incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos e coradas com DAPI (0,7 ng/µl) e *Phalloidin-A488* (2,5%) por 20 minutos, no escuro. O excesso de corante foi removido por lavagens com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas histológicas com meio *ProLong*[™] *Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen) e seladas com esmalte, e as amostras em placas permaneceram em PBS para análise por *high*

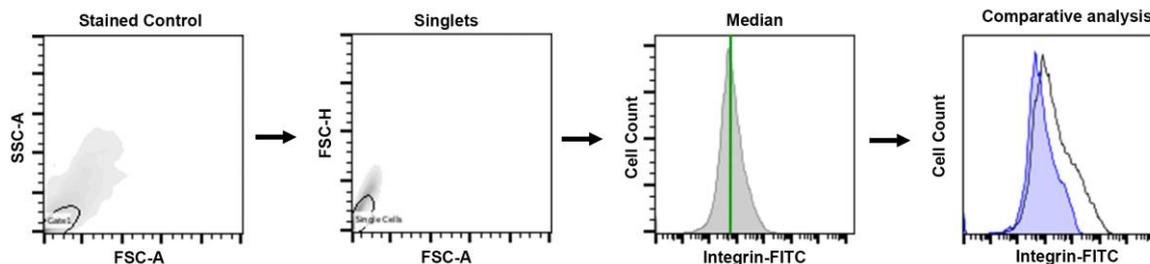
content screening em microscópio de epifluorescência (*ImageXpress Micro XLS+*, Molecular Devices), sob aumento de 20x e 40x. Imagens de quatro sítios aleatórios por amostra foram adquiridas no *software MetaXpress* (Molecular Devices), para avaliação da morfologia de células individuais. No *software FIJI* (ImageJ), a imagem binária do filtro FITC foi utilizada, com *threshold* personalizado para englobar a célula totalmente. Os resultados de 300 células, obtidas de três ensaios realizados em dias diferentes, com o mesmo lote de SEVh porém passagens celulares distintas, foi avaliado pelo índice de circularidade celular.

$$\text{Circularidade} = \frac{4\pi \times \text{área}}{\text{perímetro}} \quad (2)$$

4.3.7 Imunofenotipagem de Integrinas por Citometria de Fluxo

Células preparadas conforme o desenho experimental (ver 4.3.1) foram retiradas da incubação, lavadas em PBS gelado e coletadas por raspagem mecânica no gelo. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 8 minutos a 4 °C, e o *pellet* foi ressuspenso em PBS contendo os anticorpos primários para integrina $\beta 1$ (1 μg /amostra, #13590 Santa Cruz Biotechnology) e integrina $\beta 3$ (0,125 μg /amostra, #110131 Abcam). Após 1 hora de incubação a 4 °C, as células foram lavadas duas vezes com PBS, com *spins* a 1.200 rpm por 10 minutos a 4 °C, e incubadas com o anticorpo secundário por 45 minutos a 4 °C (*Goat Anti-Mouse IgG H&L [FITC]*, 1:1.000, #6785 Abcam). As amostras foram lavadas duas vezes com PBS (1.200 rpm, 10 minutos, 4 °C) e ressuspendidas em PBS para análise por citometria de fluxo no equipamento *BD Accuri™ C6* (BD Biosciences).

Um total de 15,000 eventos foi capturado por replicata (n = 3). Realizamos a remoção de *doublets* por estratégia de *gating* tradicional, e os *singlets* foram demonstrados em histogramas para determinação da mediana (Figura 15). A comparação da população foi efetuada no *software FlowJo* (v.10.8.1), usando os valores de *SE Dymax %Positive* (*super enhanced Dymax*). Foram avaliados três ensaios realizados em dias diferentes, com o mesmo lote de SEVh porém passagens celulares distintas.

Figura 15 – Imunofenotipagem de Integrinas por Citometria de Fluxo

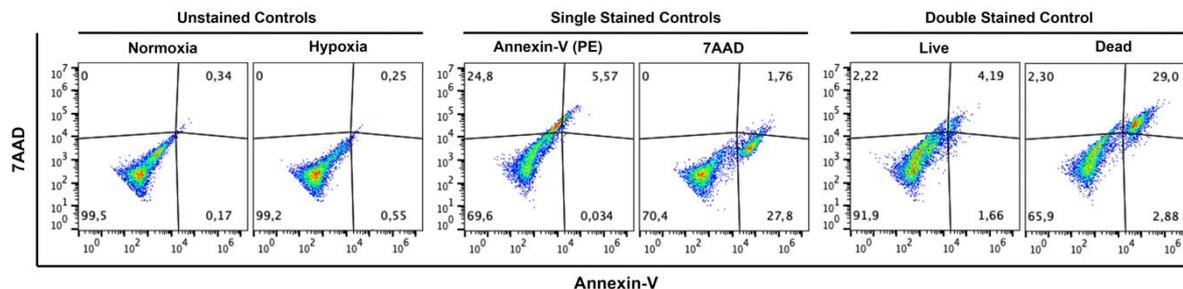
Estratégia de *gating* para avaliação da imunofenotipagem de integrinas no programa FlowJo.

FONTE: Pachane *et al*, 2022 (suplementar).

4.3.8 Ensaio de Apoptose por Citometria de Fluxo

Placas contendo as células preparadas conforme o desenho experimental (ver 3.3.1) foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, O meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com PBS e foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições. Adicionou-se aos poços tampão de ligação em conjunto aos corantes 7AAD (2,5 µl) e PE (2,5 µl) do *kit Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD 559763) por 15 minutos no escuro. As placas foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células foram coletadas em tampão de ligação, com auxílio de *cell scraper*, e mantidas no gelo durante a análise por citometria de fluxo (*BD Accuri C6, BD Biosciences*). Ajustamos as configurações do equipamento para análise de 15.000 eventos por amostra. Foram mantidos 4 controles experimentais: utilizamos células não tratadas e não coradas; células mortas por aquecimento a 80 °C coradas com 7AAD; células mortas por aquecimento a 80 °C coradas com PE; e células duplamente marcadas com PE e 7AAD. A análise dos resultados foi realizada pelo *software FlowJo* (v.10.8.1), utilizando a estratégia de *gating* descrita abaixo (Figura 16). Foram avaliados três ensaios realizados em dias diferentes, com o mesmo lote de SEVh porém passagens celulares distintas.

Figura 16 – Controles do Ensaio de Apoptose por Citometria de Fluxo



Estratégia de *gating* para avaliação da apoptose celular por citometria de fluxo, preparado no programa FlowJo. FONTE: Pachane *et al.*, 2022 (suplementar).

4.3.9 Análise estatística

A presença de *outliers* foi verificada utilizando o método ROUT (*robust regression followed by outlier identification*). Foram realizados testes de normalidade de *D'Agostino & Pearson omnibus K2* ($n \geq 9$) ou *Shapiro-Wilk* ($n < 9$) para determinação da distribuição gaussiana. Em caso de lognormalidade, os dados foram transformados em \log_{10} antes da análise.

Dados paramétricos foram analisados por ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey. Dados não paramétricos foram avaliados por análise de variância de *Kruskal-Wallis*, com pós-teste de múltiplas comparações de *Dunn*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou desvio do erro da média, se paramétricos; e mediana \pm interquartil se não-paramétricos. A análise dos dados e gráficos foi realizada no *software* GraphPad Prism (v. 9.3).

4.4 RESULTADOS

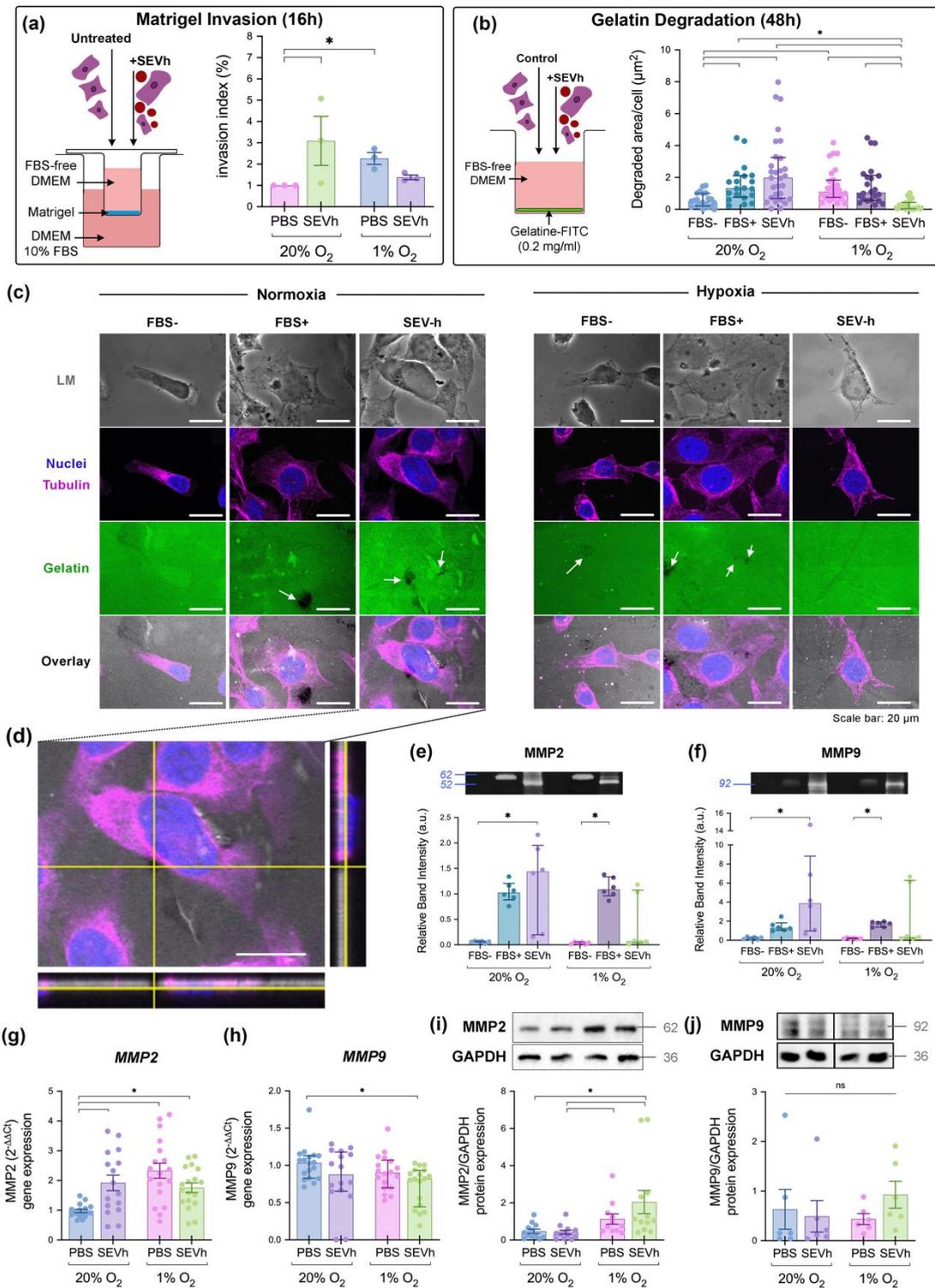
4.4.1 Indução da Invasão de MDA-MB-231 por SEVh

Utilizamos dois métodos complementares para avaliação da invasão celular *in vitro*: a câmara de invasão com *coating* de Matrigel e a invasão em lamínula recoberta por gelatina fluorescente. A invasão em Matrigel foi induzida por hipóxia e por tratamento com SEVh em normóxia após 16 horas (Figura 17A). Entretanto, não observamos invasão em hipóxia com tratamento de SEVh, o que sugere a necessidade de oxigênio para indução da invasão mediada por EVs.

Resultados similares mediados por SEVh foram observados na invasão em gelatina, onde a degradação da matriz não foi observada em células tratadas em hipóxia (Figura 17B). A sinalização decorrente de SEVh em normóxia promoveu invasão em gelatina após 48 horas, assim como o controle não-tratado em hipóxia. O tamanho e abundância dos pontos de degradação da matriz fluorescente variou entre os grupos (Figura 17C) e estava mais pronunciada em células tratadas com SEVh em normóxia (Figura 17D). Supúnhamos que os pontos de degradação estariam localizados na periferia celular, mas poucas células se colocaram com eles, sugerindo que a motilidade celular foi favorecida nesta condição.

Devido à atividade gelatinase, investigamos os efeitos de SEVh e hipóxia na ativação de MMP2 e MMP9. Verificamos um aumento significativo da atividade de MMP2 (Figura 17E) e MMP9 solúveis (Figura 17F) após 48 horas da exposição em normóxia com SEVh. A banda de MMP2 foi detectada abaixo do esperado (52 kDa) nos grupos tratados com SEV, mas manteve-se a 62 kDa no controle positivo (FBS⁺). Referente à expressão gênica, a sinalização por SEVh e/ou a hipóxia aumentaram drasticamente os níveis de *MMP2* (Figura 17G), e *MMP9* foi reduzida após tratamento com SEVh em hipóxia (Figura 17H). Entretanto, estes resultados não foram mantidos na expressão proteica: a MMP2 foi aumentada apenas em células tratadas com SEVh em hipóxia (Figura 17I) e MMP9 não variou estatisticamente entre os grupos (Figura 17J), sugerindo que SEVh e hipóxia atuam em mecanismos diferentes de regulação da expressão de gelatinase.

Figura 17 – Invasão Celular Mediada por SEVh



A – Diagrama da câmara de invasão ao Matrigel e resultados após 16 horas de incubação. **B** – Diagrama do ensaio de degradação de gelatina fluorescente e resultados da área degradada após 48 horas. **C** – Imagens de microscopia confocal do ensaio invasão em gelatina fluorescente em campo claro (LM), com marcação do núcleo (DAPI, azul), tubulina (rosa) e gelatina (fluoresceína, verde). Pontos de degradação indicados com setas brancas (barra de escala: 20 µm). **D** – Visão ortogonal do grupo normóxia SEVh com ponto de degradação próximo ao corpo celular (barra de escala: 20 µm). **E-F** – Atividade proteolítica de MMP2 e MMP9 no sobrenadante do ensaio de invasão em gelatina. **G-H** – Expressão gênica de *MMP2* e *MMP9* em MDA-MB-231. **I-J** – Expressão proteica de MMP2 e MMP9 em MDA-MB-231. * $p < 0,05$. FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

4.4.2 Promoção do Fenótipo Migratório de MDA-MB-231 em Normóxia por SEVh

A interpretação visual das imagens de microscopia de fluorescência indicaram que a morfologia celular foi modificada pelo tratamento com SEVh em todas as condições, especialmente sob Matrigel (Figura 18A). Células não-tratadas em normóxia apresentam um arranjo particular da F-actina, com fibras paralelas cruzando o citoplasma em um eixo determinado. Este padrão é alterado em hipóxia e/ou com tratamento de SEVh, o que gera uma concentração de F-actina ao longo do perímetro celular. O mesmo comportamento é visível em células plaqueadas sem matriz exógena e em matriz de gelatina. Identificamos em células tratadas com SEVh em normóxia a presença de invadopódios, protuberâncias da membrana celular ricas em F-actina que são dispostas na periferia celular (Figura 18B) (Alblazi; Siar, 2015).

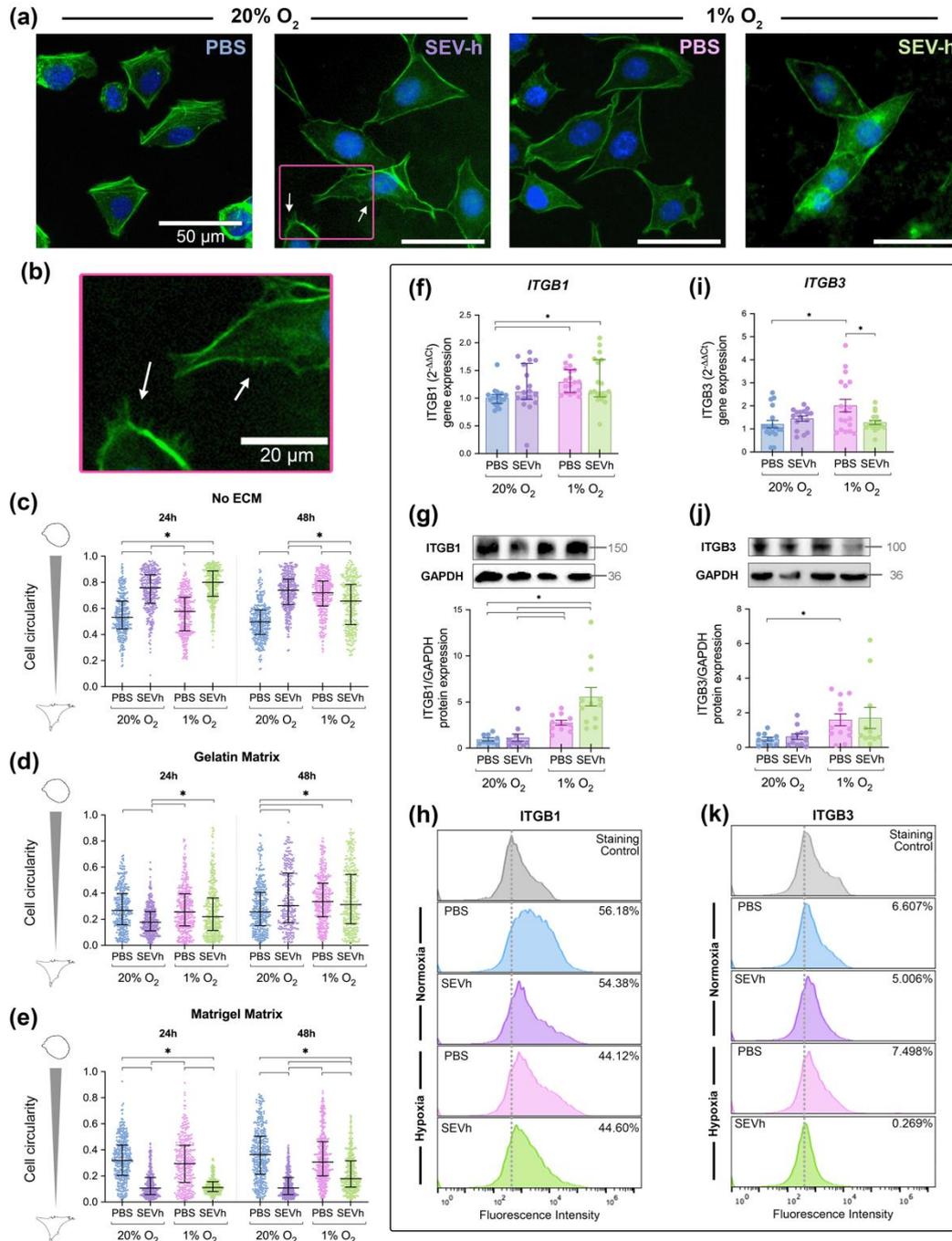
De forma geral, a circularidade celular diminuiu após a adesão a matrizes derivadas de colágeno por 24 e 48 horas (Figuras 18C-E). Em situações sem matriz exógena, o tratamento com SEVh em hipóxia e normóxia aumentou a circularidade celular em comparação aos respectivos controles tanto em 24 horas, quanto em 48 horas (Figura 18C). Em matrizes de colágeno, esse comportamento foi alterado: após 24 horas do plaqueamento, células normóxicas tratadas com SEVh tornaram-se 32% mais alongadas em gelatina que em placas sem matriz exógena (Figura 18D), e 58% mais alongadas em Matrigel (Figura 18E). Considerando que o aumento da circularidade celular pode ser resultante do estresse celular, este resultado sugere que qualquer tipo de ECM derivada de colágeno pode ser essencial ao desenvolvimento do fenótipo migratório no TNBC.

4.4.3 Alteração no Perfil de Integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ em Hipóxia

A alteração do fenótipo de MDA-MB-231 mediante tratamento com SEVh sugere que a interação entre células e ECM esteja sendo modulada pela oxigenação celular. Por meio de análises de expressão gênica e proteica das integrinas $\beta 1$ (ITGB1) e $\beta 3$ (ITGB3), que são cruciais na regulação da migração e invasão (Hamidi; Ivaska, 2018), observamos que apenas a hipóxia altera o perfil de expressão dos receptores, especialmente de ITGB1. Em hipóxia, a expressão gênica (Figura 18F) e proteica (Figura 18G) da integrina $\beta 1$ foi aumentada, entretanto a disponibilização

dessa integrina na superfície celular foi diminuída especialmente sob ação de SEVh (Figura 18H).

Figura 18 – Alterações Fenotípicas de MDA-MB-231 sob Hipóxia ou SEVh



A – Imagens de MDA-MB-231 em Matrigel, tratada (SEVh) ou não (PBS) por 24 horas em normóxia (20% O₂) ou hipóxia (1% O₂). Setas brancas indicando invadopódios (barra de escala: 50 μm). **B** – Detalhamento de invadopódios em células normóxicas tratadas com SEVh (barra de escala: 20 μm). **C-E** – Circularidade celular após 24 e 48 horas de incubação de MDA-MB-231 em superfícies (C) sem matriz, (D) com gelatina, ou (E) com Matrigel. **F-G** – Expressão gênica e proteica da integrina β1. **H** – Imunofenotipagem da integrina β1 superficial. **I-J** – Expressão gênica e proteica da integrina β3. **K** – Imunofenotipagem da integrina β3 superficial. * *p* < 0,05. FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

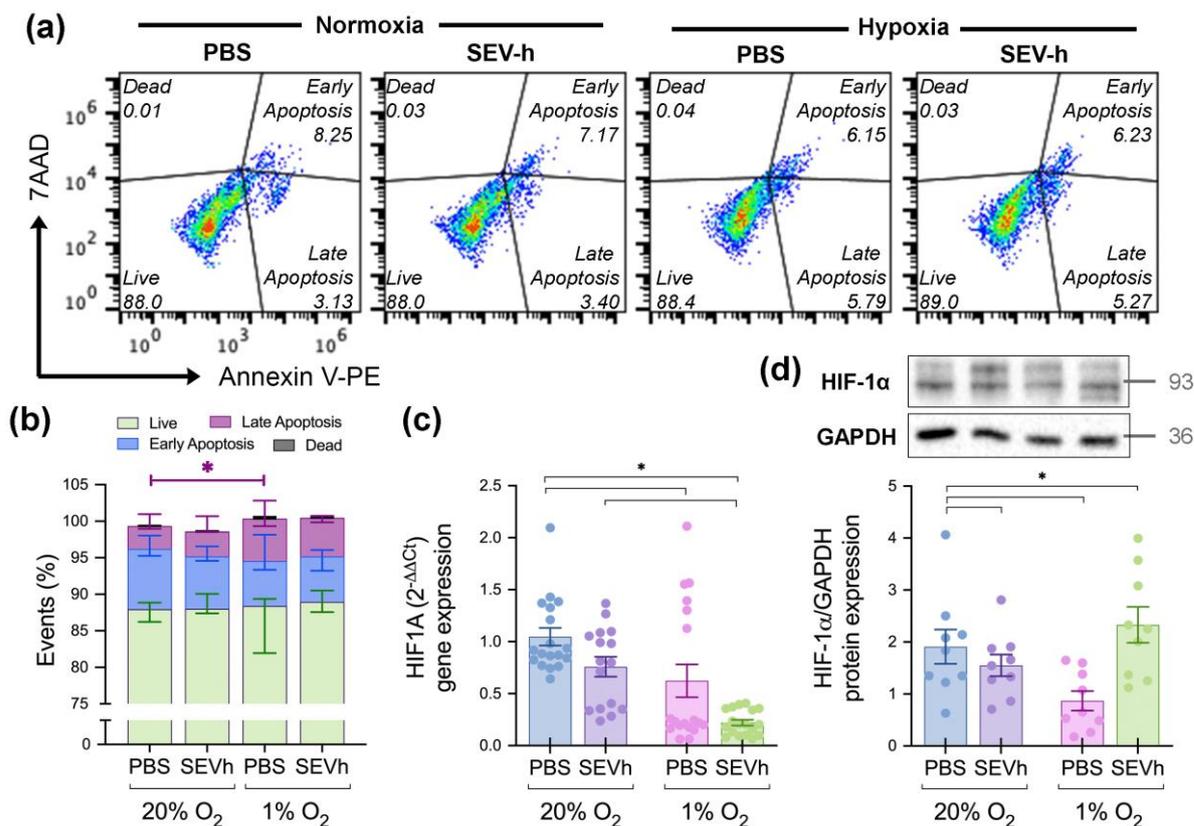
Apesar de SEVh não interferir com a expressão da integrina $\beta 3$ na normóxia, ela diminuiu a expressão gênica por 36,6% em hipóxia (Figura 18I). Por *western blotting*, não identificamos alterações na expressão proteica da integrina $\beta 3$ (Figura 18J), mas sua disponibilização na superfície celular foi reduzida a níveis basais (Figura 18K). Nossos resultados sugerem que SEVh não interfere com a expressão de integrinas importantes para o comportamento pró-tumoral, mas auxilia nos mecanismos de disponibilização dos receptores na superfície celular.

4.4.5 Apoptose Mediada por Hipóxia é Modulada por SEVh em TNBC

A regulação da morte celular por apoptose, necrose, autofagia ou outros processos em hipóxia é um dos mecanismos mais conhecidos da resposta celular ao estresse oxidativo (Qiu; Li; Ji, 2015). Ao investigarmos a resposta da hipóxia ao apoptose, verificamos que a atmosfera de 1% O_2 aumentou a porcentagem de células em apoptose tardia em comparação ao controle não-tratado em normóxia (Figura 19A-B). Os outros destinos celulares (apoptose inicial, células vivas e células mortas) não tiveram alterações significativas. Não observamos diferenças significativas na apoptose de células tratadas com SEVh, indicando que as vesículas podem auxiliar na modulação da resposta apoptótica mediada por hipóxia, mas não promovem morte celular em células normóxicas.

A regulação da apoptose mediada por hipóxia é realizada pela via do HIF, cujo principal componente (HIF-1) controla o equilíbrio entre sinais pró- e anti-angiogênicos. A proteína HIF-1 é um heterodímero formado quando a subunidade α evade ubiquitinação e se une à subunidade β , tornando-se funcional (Greijer; Wall, 2004). Observamos que a expressão gênica de *HIF1A* é reduzida em células hipóxicas, independentemente da exposição à SEVh (Figura 19C). Entretanto, há uma tendência não-significativa de redução da expressão gênica de *HIF1A*, especialmente em hipóxia ($p = 0,07$). A expressão proteica de HIF1A seguiu as mesmas tendências, mas o tratamento com SEVh aumentou seus níveis em hipóxia (Figura 19D). Este resultado paradoxal pode sugerir que SEVh está interferindo com o mecanismo regulatório de HIF-1 α quando o estresse oxidativo é estabelecido.

Figura 19 – Respostas HIF-independentes em Células Tratadas com SEVh

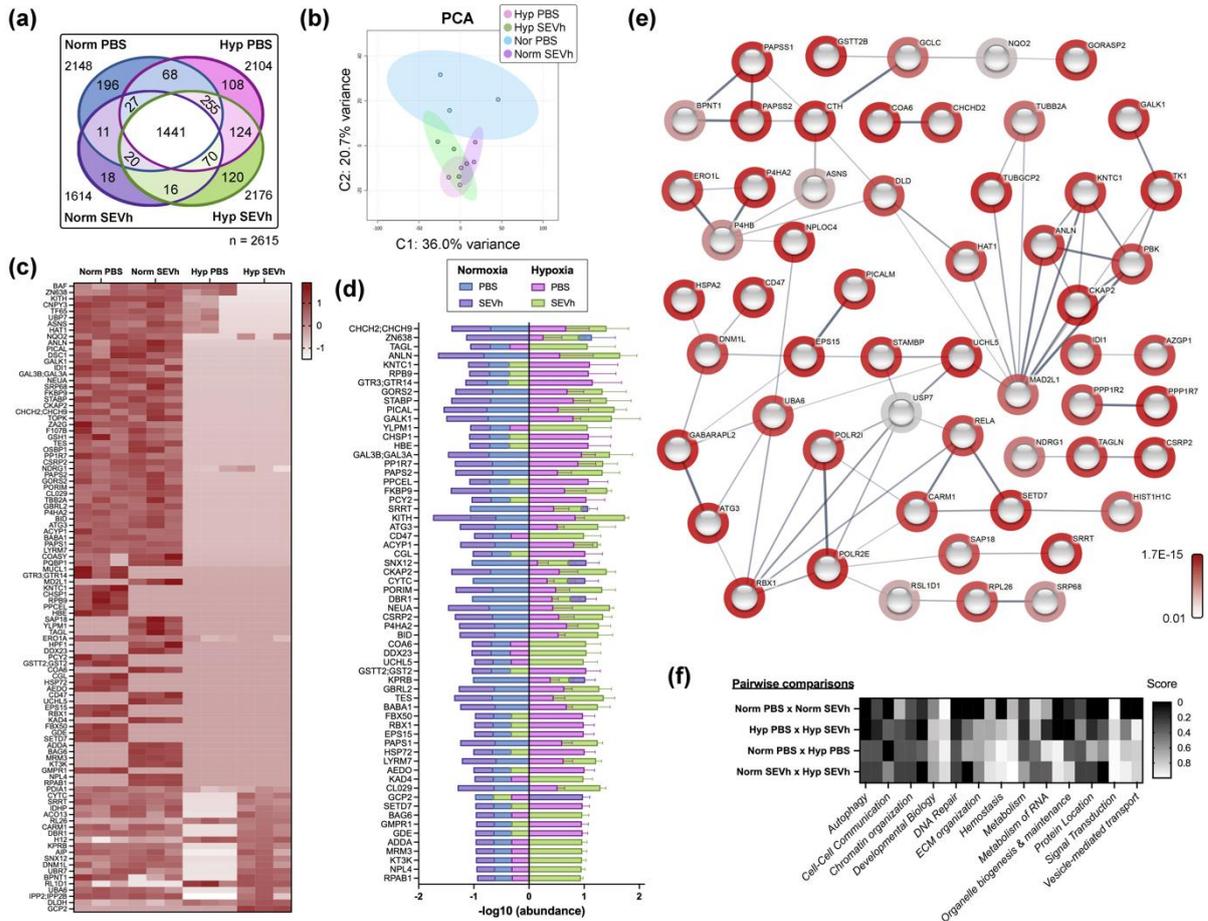


A – Apoptose de MDA-MB-231 sob normóxia ou hipóxia, tratada com SEVh, com as populações médias (%) de dois ensaios independentes em triplicatas técnicas. **B** – Comparação dos destinos celulares possíveis (células vivas, verde; apoptose inicial, azul; apoptose tardia, rosa; células mortas, cinza). **C-D** – Expressão gênica e proteica de HIF-1α. * $p < 0,05$. FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

4.4.6 Proteoma Comparativo de MDA-MB-231

Ao compararmos o proteoma de células expostas à SEVh sob hipóxia e normóxia, verificamos quatro perfis distintos. Detectamos 2,615 proteínas no total, sendo 1,441 proteínas comuns a todos os grupos. Encontramos 11 proteínas exclusivas aos grupos de normóxia e 124 aos grupos de hipóxia, com 196 proteínas únicas em células não-tratadas normóxicas (PBS-N), 19 em células tratadas normóxicas (SEVh-N), 108 em células não-tratadas hipóxicas (PBS-H) e 120 em células tratadas hipóxicas (SEVh-H). Proteínas comuns a dois ou mais grupos estão descritas no diagrama de Venn (Figura 20A). O PCA uniu as replicaras conforme sua característica determinante, com valores de PC correspondendo a 36,0%, 20,7%, 11,8%, 10,2% e 4,8% da variância designada (Figura 20B).

Figura 20 – Proteoma Comparativo de MDA-MB-231



A – Distribuição de proteínas em células MDA-MB-231 incubadas em normóxia (Norm) ou hipóxia (Hyp) na presença ou ausência de SEVh. **B** – Valores de PCA da análise proteômica. **C** – Heatmap das 105 proteínas mais diferentemente expressas em células expostas a SEVh em normóxia ou hipóxia ($p < 0,05$). **D** – Valores da abundância das 62 proteínas mais expressas entre os grupos ($p < 0,01$). **E** – Mapa de interações das proteínas mais expressas em amostras celulares, criada no String-DB. Halos indicam a força dos valores de p da análise estatística dos dados normalizados. Espessura dos conectores indicam a confiança das interações. **F** – Heatmap da análise de enriquecimento realizada no Reactome ($p < 0,05$). FONTE: Pachane *et al.*, 2022.

A análise estatística univariada identificou 105 proteínas com expressão diferenciada entre os quatro grupos ($p < 0,05$) (Figura 20C), com expressão distinta dentre as comparações pareadas (Tabela 8). As 62 proteínas mais divergentes ($p < 0,01$) entre os grupos estão dispostas na Figura 20D e seu mapa de interações está na Figura 20E. As dez proteínas mais abundantes de cada grupo, junto de seus valores de TIC, estão dispostas na Tabela 9. O proteoma comparativo completo está disponível sob o ID PXD035244 na base de dados ProteomeXchange.

Tabela 8 - Contagem de Proteínas Diferencialmente Expressas por Proteômica

	Normóxia PBS	Normóxia EVh	Hipóxia PBS	Hipóxia EVh
Normóxia PBS	-	-	-	-
Normóxia EVh	18	-	-	-
Hipóxia PBS	79	-	-	-
Hipóxia EVh	80	66	42	-

FONTE: Bianca C. Pachane (2022)

Tabela 9 – Dez proteínas com maior score em MDA-MB-231

	Normóxia PBS		Normóxia SEVh		Hipóxia PBS		Hipóxia SEVh	
	Proteína	TIC	Proteína	TIC	Proteína	TIC	Proteína	TIC
1	CD166	78193.79	CD166	91630.2875	CD166	61860.54	CD166	56244.09
2	PTPRA	52337.20	EGLN	41343.6434	PTPRA	36389.88	PTPRA	46113.69
3	EGLN	31064.89	PTPRA	40731.4585	EGLN	34346.54	EGLN	27650.73
4	TEBP	21502.70	JAK1	23866.0662	GLU2B	32680.50	GLU2B	23942.60
5	GLU2B	20988.29	GLU2B	23853.9594	DHPR	23202.68	DHPR	18286.52
6	SRSF7	20873.90	PI4KA	13587.5165	PPAL	20745.47	PPAL	18003.00
7	JAK1	19205.85	BCR;ABR	12895.9156	JAK1	17351.60	JAK1	14324.37
8	BCR;ABR	12800.05	CDC37	11934.5486	TRFM	14608.45	TRFM	14093.54
9	TRFM	12710.24	TRFM	11457.6037	RL21	13546.76	INGR1	13679.96
10	INGR1	11853.25	NHRF2	11447.1583	NHRF2	13098.61	RL21	12769.99

Fonte: Bianca C. Pachane, 2022

SEVh interfere diretamente no proteoma de células em normóxia, atuando especialmente na regulação do complexo de ligação da γ -tubulina (TUBGCP6, TUBG1, TUBGCP3 e TUBGCP2, FDR: $9,7 \times 10^{-6}$), aumentando a nucleação dos microtúbulos (FDR: 0,00026) e polimerização proteica (FDR: 0,00033). Outras vias adicionais promovidas por SEVh incluem a biogênese mitocondrial, ciclo do ácido cítrico e síntese das enzimas ubiquitina E1 e E2 (FDR: 0,171). As vias favorecidas por SEV em normóxia promovem alterações substanciais no metabolismo celular, favorecendo o ciclo celular e sobrevivência de células tumorais.

Em hipóxia, o tratamento com SEVh levou à vias distintas, favorecendo a resposta ao estresse (KEAP1, RBX1, POLR2C, POLR2I, ADD1, SETD7, NPLOC4, NCCRP1, UCHL5, CTH, BAG6, HSPA2, AK4, C4orf27 e POLR2E; FDR: 0,0182) e outros processos metabólicos ($p = 0,0239$). Verificamos favorecimento da biogênese

e *splicing* de mRNA (PQBP1, POLR2C, POLR2I, DDX23 e POLR2E), reparo do DNA (RBX1, POLR2C, POLR2I, NPLOC4 e POLR2E) e degradação de cisteína e homocisteína (FDR: 0,0804), indicando que a sinalização de SEVh em células tumorais é dependente de oxigênio e promove respostas contrastantes.

Em ambos os grupos de hipóxia, verificamos alterações no metabolismo celular, particularmente com o aumento da atividade catabólica (PBS-H: FDR = 0,00602; SEVh-H: FDR = 0,0069) e resposta ao estresse (PBS-H: FDR = 0,334). Verificamos um favorecimento sutil da morte celular programada, que é uma das principais respostas celulares à hipóxia, mas principalmente um aumento na autofagia foi detectado (PBS-H: FDR = 0,334; SEVh-H: FDR = 0,25). Proteínas relacionadas ao dano e reparo do DNA, incluindo USP7, BABAM1, RBX1 e POLR2I (FDR: 0,334), foram identificadas em células não-tratadas em hipóxia.

Células tratadas com SEVh em hipóxia aumentaram sua expressão de vias mitocondriais e proteolíticas em comparação à normóxia, incluindo o transporte e síntese de PAPS (FDR: 0,0899) e enzimas de deubiquitinização (DUBs, FDR = 0,205). Os detalhes das vias de enriquecimento estão dispostos na Figura 20F. A lista completa do proteoma diferencial de MDA-MB-231 está disponível no Anexo D.

4.5 DISCUSSÃO

A invasão celular é crítica para o início da cascata metastática, permitindo que células tumorais se destaquem do sítio primário em busca de um novo nicho de desenvolvimento (Chambers; Werb, 2015). Um dos fatores que promovem este comportamento é a hipóxia intratumoral, cujo estabelecimento é diretamente resultante do aumento das taxas de proliferação e consumo de nutrientes pelo tecido tumoral (Taware *et al.*, 2020). Considerando que a hipóxia é essencial para a modulação de respostas pró-tumorais, demonstramos neste capítulo que SEVh contribui também para a progressão tumoral e resposta invasiva de células de TNBC, particularmente sob condições ótimas de oxigênio.

Para investigar a influência de SEVh em células de TNBC, estabelecemos um desenho experimental que nos permitiu explorar os efeitos esperados em um cenário tumoral, onde as células de uma área hipóxica se comunicam através de EVs com seus arredores, incluindo outras células hipóxicas e células normóxicas (Jiang *et al.*, 2022). A comunicação de longa distância é uma das funções básicas de EVs, mas isso não exclui a possibilidade da ocorrência de sinalização proximal (Milane *et al.*, 2015). No nosso desenho, introduzimos as células ao ambiente hipóxico (1% O₂) imediatamente após o plaqueamento, divergindo de outros estudos (Taware *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2016). A hipóxia pode ser estabelecida de forma química ou atmosférica, variando de 0,1 a 5% (Bernhardt *et al.*, 2019; Grayson *et al.*, 2007; Hannafon *et al.*, 2019; Hoffmann *et al.*, 2018; Schmaltz *et al.*, 1998; Sesé *et al.*, 2017). Devido à essa variação, corroboramos alguns resultados da literatura, como o aumento do rendimento de EVh (King; Michael; Gleadle, 2012), apoptose (Rana; Singh; Koch, 2019) e invasão celular (Wang *et al.*, 2014), mas outros divergiram, como os perfis de integrina (Casali *et al.*, 2022) e HIF-1 α (Bos *et al.*, 2003).

A principal via de ação da hipóxia envolve HIF-1. Em tecidos saudáveis, o HIF-1 é hidroxilado em um resíduo conservado de prolina, marcando-o para degradação proteassomal; entretanto, em hipóxia, espécies reativas de oxigênio (ROS) inibem essa clivagem por enzimas do domínio proлил-hidroxilase (PHD), permitindo portanto a ligação das subunidades de HIF. Isso forma um regulador transcricional que interfere diretamente com o metabolismo, homeostase redox, angiogênese, tumorigênese e inflamação (Majmundar; Wong; Simon, 2010). Nossos resultados demonstraram uma redução na expressão proteica de HIF-1 α em células

hipóxicas sem tratamento e células normóxicas tratadas com SEVh, mas um aumento da expressão proteica em células hipóxicas expostas à SEVh. A expressão gênica reduzida em células não-tratadas em hipóxia provavelmente é decorrente a desrupção de dois domínios de transativação (TAD), os quais estabilizam a molécula de HIF-1 contra degradação proteossomal e regulam a expressão gênica com outros co-fatores (Rashid *et al.*, 2021). Observamos que o tratamento de células hipóxicas com SEVh reduziram a expressão gênica mas aumentaram sua expressão proteica, sugerindo um papel regulatório de conteúdos carregados por SEVh na expressão proteica. Como visto na análise proteômica, a redução dos níveis de oxigênio regula o metabolismo do câncer, favorecendo o catabolismo e a resposta ao estresse em relação a outros processos celulares.

A ativação de HIF-1 promove respostas pró-tumorais como o remodelamento da matriz extracelular, seja por indução de secreção proteica ou controle da expressão de MMPs (Ito *et al.*, 2021; Stegen *et al.*, 2019). Considerando as gelatinases, a hipóxia reduziu levemente a expressão gênica de MMP-9, mas aumentou MMP-2 significativamente ambas as expressões gênica e proteica. Ambas as gelatinases apresentam modulação de sua ativação via MMP-1, uma colagenase que conecta diretamente a sinalização do NF- κ B à ativação canônica da MMP-9 e, de forma menos eficiente, à ativação não-canônica de MMP-2 (Overall; López-Otín, 2002). O favorecimento da expressão de TIMP-1 também pode inibir a expressão de MMP-9, viabilizando comportamentos pró-metastáticos junto de miR-210 (Cui *et al.*, 2012). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a ativação de MMP-2 está sendo favorecida em relação à MMP-9 em hipóxia, seja por direta ação da pressão de oxigênio ou por EVh.

Com a alteração da composição da ECM, o padrão de expressão de integrinas também é afetado. Esses receptores celulares medeiam as respostas para dentro e para fora das células, podendo ser diferencialmente expressos em tumores com base em sua agressividade, origem celular e etapa da progressão tumoral (Gholami *et al.*, 2013; Hamidi; Ivaska, 2018). O perfil de integrinas pode ser repassado à suas vesículas extracelulares, auxiliando o tráfego vesicular, organotropismo e metástase (Hoshino *et al.*, 2015; Hurwitz; Meckes, 2019; Soung *et al.*, 2019). As integrinas β 1 e β 3 são frequentemente superexpressas no câncer e podem auxiliar as respostas de motilidade celular, adesão, invasão e angiogênese (Carter *et al.*, 2015; Danilucci *et al.*, 2019; DeRita *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2020; Montenegro *et al.*,

2017; Moritz *et al.*, 2021). Em nossa investigação, observamos que a hipóxia modula as expressões proteica e gênica das integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$, mas sua disponibilização na superfície celular pode ser regulada por SEVh. Supõe-se que a sinalização proveniente por SEVh regule os mecanismos de tráfego interno de integrinas, prevenindo certas subunidades como $\beta 3$ de atingir a superfície celular sob hipóxia.

Como consequência da expressão diferencial de integrinas, a morfologia celular é impactada, visto que os receptores de adesão são conectados, em sua cauda citoplasmática, à F-actina via talina-1. Ao passo que o segmento extracelular das integrinas liga-se à componentes da ECM, *molecular clutches* são formadas para propulsionar a célula adiante, criando uma polarização celular que promove o fenótipo migratório (Friedl; Alexander, 2011; Hamidi; Ivaska, 2018; Shattil; Kim; Ginsberg, 2010). Células TNBC apresentam uma diversidade de fenótipos possíveis, conforme a composição da ECM e sua rigidez, o que corroboramos neste trabalho (Geiger *et al.*, 2019). Em matriz complexa (Matrigel), SEVh promove alongamento celular com baixa circularidade e induz a formação de invadopódia – protrusões do citoesqueleto de F-actina na periferia celular, sendo consistente com o fenótipo migratório (Alblazi; Siar, 2015). Ambos os ensaios de invasão celular corroboraram o fenótipo invasivo de células TNBC sob sinalização de SEVh em normóxia, particularmente na presença de matrizes exógenas.

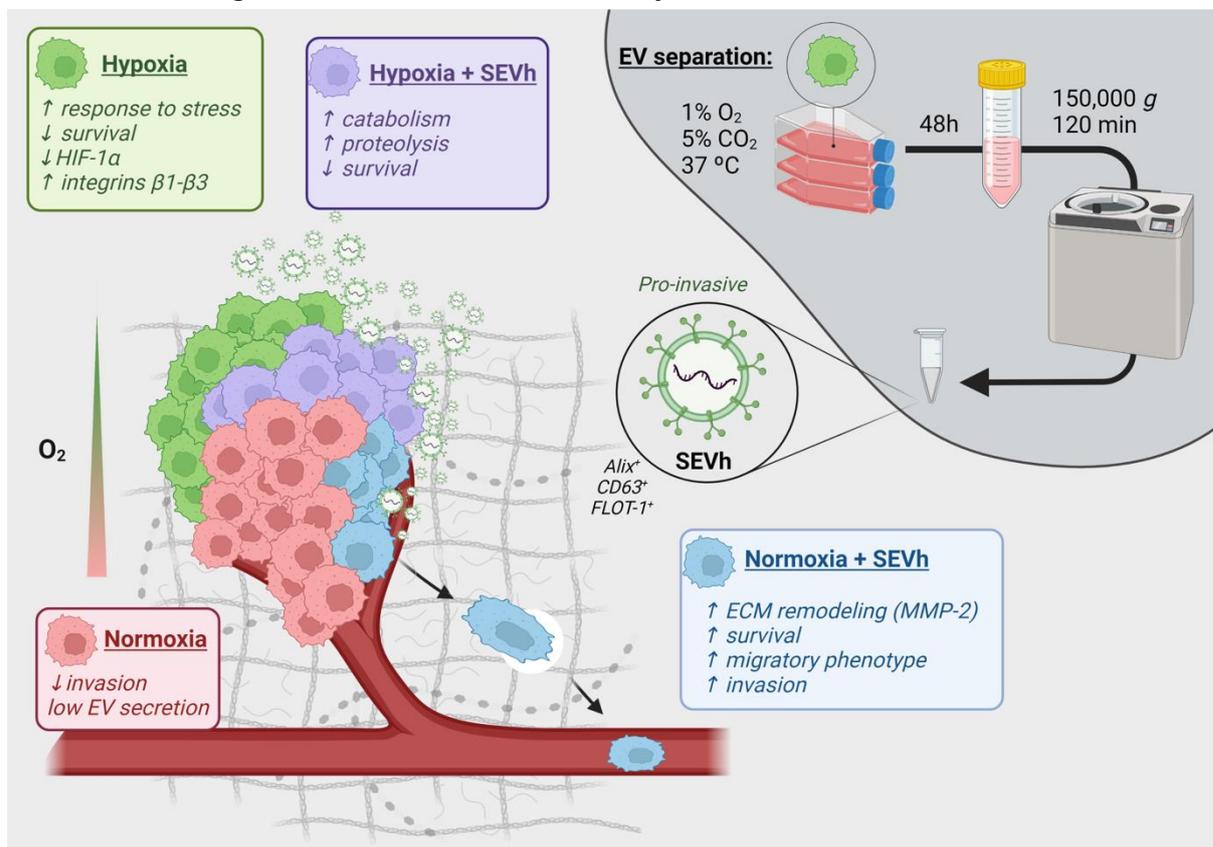
O padrão global de proteínas e vias favorecidas por células MDA-MB-231 em normóxia ou hipóxia, com ou sem tratamento com SEVh, é diferente entre os grupos. A ativação de vias de sobrevivência e a modulação do ciclo celular por SEVh em normóxia, e da proteólise e danos ao DNA em hipóxia, confirmam a importância da oxigenação na determinação do destino celular por vesículas extracelulares. O proteoma de MDA-MB-231 e de suas vesículas são conhecidos, e recentemente uma investigação dos efeitos de hipóxia leve (1,2% O₂) e agressiva (0,2% O₂) foi publicado (Bernhardt *et al.*, 2019; Palazzolo *et al.*, 2012; Strande *et al.*, 2009). No nosso estudo, demonstramos de forma inédita como SEVh modificam o proteoma de suas células originárias sob hipóxia e normóxia.

Neste trabalho, baseamos nosso estudo em uma única linhagem de célula imortalizada, o que é limitante em relação à abundância de linhagens tumorais disponíveis comercialmente e também diverge de culturas primárias. Além disso, o estresse oxidativo decorrente dos ensaios celulares não foi investigado, nem o mecanismo de associação de EVh em células.

4.6 CONCLUSÃO

A autossinalização de SEVh separados a partir da linhagem de TNBC MDA-MB-231 em hipóxia promove modificações intracelulares que favorecem a invasão em normóxia, e induz proteólise, catabolismo e, em geral, uma resposta severa ao estresse em hipóxia. A invasão celular é favorecida por SEVh sob condições vantajosas de composição de oxigênio e matriz, devido à modulação da expressão e disponibilidade da gelatinases e integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$. Essas modificações interferem no citoesqueleto de F-actina, criando um fenótipo migratório auxiliado pelo desenvolvimento de invadopódios. Células normóxicas tratadas com SEVh favorecem os processos metabólicos e ciclo celular, modulando a saúde celular, sendo que em hipóxia as células são enriquecidas em vias apoptóticas. No geral, nossos resultados demonstram a importância da sinalização hipóxica via SEV em um cenário tumoral para o estabelecimento de metástase, conforme resumido no diagrama abaixo (Figura 21).

Figura 21 - Resumo da Autossinalização de SEVh em MDA-MB-213



Graphical abstract criado em BioRender.com demonstrando as principais vias favorecidas por SEVh em TNBC. FONTE: Pachane et al., 2022.

CAPÍTULO 5 – ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO POR CO-CULTURA MULTICELULAR CIRCULANTE

5.1 INTRODUÇÃO

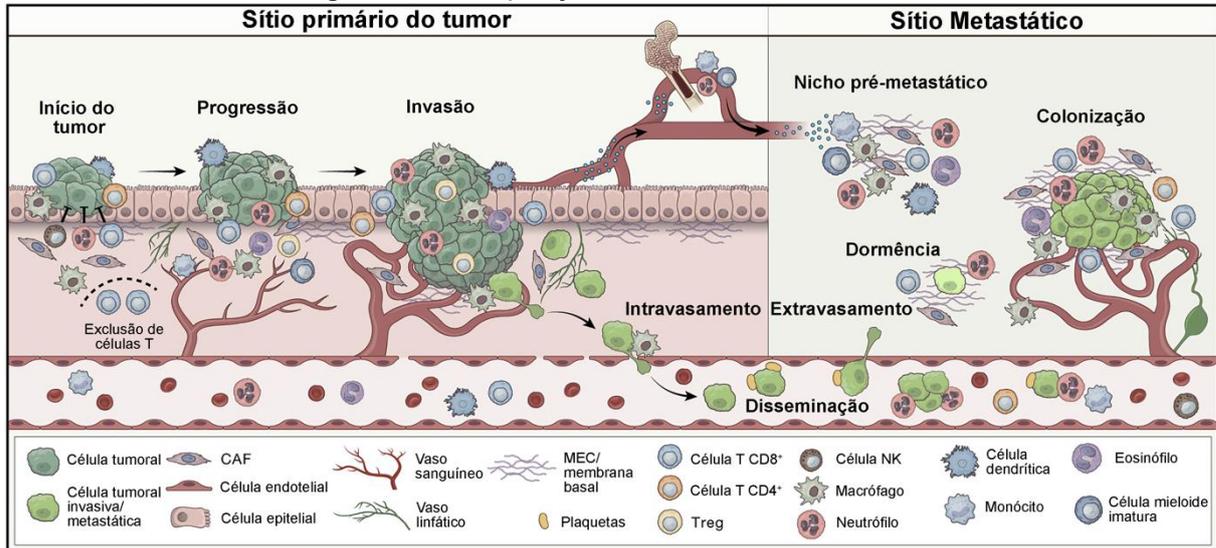
O conceito de microambiente tumoral (TME) é complexo e constantemente renovado na literatura desde a idealização do termo em 1863 por Virchow e sua definição por Paget com a teoria da “semente e solo” (Jin; Jin, 2020; Kucharzewska; Belting, 2013; Paget, 1989). Composto por células tumorais, estromais, vasos sanguíneos, fibras nervosas, matriz extracelular e componentes acelulares, o TME é crucial para a progressão tumoral, intermediando a comunicação com tecidos adjacentes e permitindo a sustentação e alimentação do tumor (Jin; Jin, 2020; Kucharzewska; Belting, 2013).

O consenso atual define o microambiente tumoral como o conjunto de diferentes nichos que favorecem comportamentos baseados na composição e necessidade do local, geralmente acompanhando a heterogeneidade fenotípica tumoral (Jin; Jin, 2020). O TME é modificado dependendo do contexto do tecido tumoral e evolui com a progressão da doença e com a heterogeneidade clonal do tumor (Dagogo-Jack; Shaw, 2018). Dentre os nichos especializados encontrados no TME, temos os microambientes hipóxico, imune, metabólico, ácido, inervado e mecânico (Jin; Jin, 2020). Esses nichos são diferentes nos sítios primários, pré-invasivos, invasivos e metastáticos, cada qual com características físicas e metabólicas determinantes (Visser; Joyce, 2023) (Figura 22).

Em tumores pré-invasivos, o TME favorece comportamentos de proliferação, migração e plasticidade, especialmente decorrente da sinalização autócrina por EGF, HGF e TGF- β (Visser; Joyce, 2023). Fibroblastos passam a se diferenciar em CAFs e secretam matriz extracelular, aumentando a rigidez local (Amos; Choi, 2021). Mediadores pró-inflamatórios como G-CSF, IL-1 β e IL-8 são secretados e estimulam monócitos, macrófagos, neutrófilos, ao mesmo tempo que o tumor inibe a atividade de células NK e linfócitos T (Visser; Joyce, 2023). A atividade dos macrófagos aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio, o que promove danos no DNA e favorece o aparecimento de TAMs. Concomitantemente, o estímulo

pró-angiogênico é iniciado mediante secreção de VEGF e FGF-2 por células em estresse oxidativo (Visser; Joyce, 2023).

Figura 22 – Composição do Microambiente Tumoral



Células, matriz e componentes do microambiente tumoral durante a fase primária de desenvolvimento e no sítio metastático. FONTE: Visser; Joyce, 2023 (traduzido).

Uma vez que o tumor atinge o perfil invasivo, as células passam a favorecer comportamentos de motilidade e invasão, além de interferir diretamente em moléculas de adesão como N-caderina, VE-caderina, E-caderina e integrinas (Hamidi; Ivaska, 2018; Visser; Joyce, 2023). CAFs passam a secretar TGF- β , que atua no favorecimento da transição epitélio-mesenquimal, e IL-6, IL-8 e VEGF para auxiliar na sobrevivência e manutenção do controle imunológico (Visser; Joyce, 2023). O controle da função dos linfócitos T é mantido por meio de citocinas derivadas do tumor e EVs, que também são responsáveis pela manutenção da tumorigênese (Kucharzewska; Belting, 2013; Visser; Joyce, 2023).

Devido à grande quantidade de personagens na dinâmica do TME e sua heterogeneidade intrínseca, seu estudo em modelos *in vivo* é dificultado por limitações físicas e de material, de modo que grande parte dos estudos sobre TME utilizam-se de biópsias de pacientes ou de modelos *in vivo* (Cerapio *et al.*, 2024). A fim de facilitar o estudo do TME sem a utilização de metodologias invasivas, como os modelos supracitados, mas mantendo em partes a complexidade encontrada no TME, neste capítulo exploramos uma técnica que permite o co-cultivo de células do TME em câmaras separadas, mas interconectadas por canaletas, facilitando a avaliação da

resposta individual ao estímulo providenciado por EVs tumorais derivadas de hipóxia. Os resultados deste capítulo estão sendo organizados em manuscrito para publicação em revista indexada.

5.2 OBJETIVOS

Investigar o papel das vesículas extracelulares isoladas de células tumorais de mama triplo-negativas sob condições hipóxicas no seu microambiente tumoral *in vitro*.

5.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da co-cultura entre células tumorais (MDA-MB-231), endoteliais (HUVEC), estromais (HDFa) e monocíticas (THP-1) sob três modelos, com contato direto, contato indireto e sob fluxo de meio de cultura;
- Examinar a influência das EV hipóxicas de MDA-MB-231 na invasão celular, na presença de monócitos (THP-1), macrófagos (THP-1 diferenciado) e fibroblastos (HDFa).

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Cultivo Celular

Células aderentes foram mantidas sob cultivo conforme as condições de manejo descritas anteriormente (ver 3.3.1). Células de adenocarcinoma mamário triplo-negativo humanos da linhagem MDA-MB-231 (ATCC[®] CRM-HTB-26[™]) foram cultivadas entre as passagens 40 a 50 em meio Leibovitz L-15 suplementado com FBS (10%). Os frascos foram mantidos sob incubação a 37 °C sem contato com CO₂. Células de fibroblasto humanos dérmicos da linhagem HDFa (ATCC[®] PCS-201-012[™]) foram mantidas entre as passagens 30 e 45 em meio DMEM suplementado com FBS (10%) e antibiótico (penicilina e estreptomicina, 1%). Os frascos foram incubados em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Células endoteliais humanas de cordão umbilical da linhagem HUVEC (ATCC[®] CRL-1730[™]) foram cultivadas entre as passagens 6 e 20 em meio DMEM suplementado com FBS (10%) e antibiótico (penicilina e estreptomicina, 1%) em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Células de monócitos humanos da linhagem THP-1 (ATCC[®] TIB-202[™]) foram mantidas sob suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com FBS (10%) e antibiótico (penicilina e estreptomicina, 1%) na densidade média de 10⁵ células/ml, a 37 °C, 5% CO₂.

5.3.1.1 Detecção de *Mycoplasma* por Luciferase

O sobrenadante das células em cultivo foi coletado e centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos para remoção de células suspensas, e congelados imediatamente a -20 °C até o momento da experimentação. Os reagentes do *kit MycoAlert[®] Assay* (Lonza) foram levados a temperatura ambiente antes do uso e reconstituídos em tampão por 15 minutos conforme descrito pelo fabricante. Os sobrenadantes foram colocados em placa branca de 96 poços junto do branco (i.e., tampão) e do controle positivo (#LT07-518, Lonza), e misturados a 100 µl do reagente. Após 5 minutos, a placa foi lida por luminescência em leitor de placas (*Synergy H1*, BioTek) e os valores anotados (A). Em seguida, 100 µl do substrato foi adicionado aos poços e, após 10 minutos, uma nova leitura foi realizada (B). A razão B/A foi calculada para cada amostra e os resultados inferiores a 0,9 foram considerados negativos para *Mycoplasma*. Os ensaios a seguir foram realizados com células negativadas.

5.3.2 Diferenciação de Monócitos em Macrófagos

Células THP-1 foram semeadas na concentração de 6×10^5 células/ml em meio RPMI 10% FBS em placas de 6 poços ou placas de 96 poços. Para diferenciação, o meio foi suplementado com 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ou EVh (10^9 partículas/ml) e incubado a 37 °C por 72 horas. Células não-tratadas (*i.e.*, PBS) foram mantidas em paralelo. A diferenciação foi monitorada em tempo real com o microscópio *timelapse Lux2* (CytoSMART), onde 72 fotos foram adquiridas no mesmo campo em intervalos de 60 minutos por três dias. As imagens foram processadas utilizando o software FIJI (Image J) (Schindelin *et al.*, 2012). Ao final da incubação, o meio condicionado foi centrifugado (1.200 rpm, 5 minutos) e coletado para avaliação de citocinas inflamatórias por ELISA (ver 5.3.10). As células aderidas foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Após duas lavagens com PBS, as células foram marcadas com *Phalloidin-A488* (2,5%) em solução de DAPI (0,7 ng/ μ l) por 20 minutos em temperatura ambiente. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e avaliados por microscopia de epifluorescência em aumento de 40x (*ImageXpress Micro XRS+*, Molecular Devices). Os experimentos foram repetidos em três ocasiões independentes por grupo.

5.3.3 Motilidade Celular por Microscopia em Tempo Real

Células MDA-MB-231 (5×10^4 células), HUVEC (5×10^4 células), HDFa (1×10^4 células) foram semeadas em placas de 24 poços em seus respectivos meios de cultivo e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ para adesão. O meio foi substituído em seguida por OptiMEM. Células THP-1 foram diluídas em OptiMEM para atingir a concentração celular de 10^5 células/ml em placas de 6 poços. Após tratamento com EVh (10^9 partículas/ml), as células foram monitoradas por microscopia em tempo real utilizando o microscópio *timelapse Lux2* (CytoSMART), com fotos capturadas em intervalos de 30 minutos por 24 horas durante a incubação a 37 °C, 5% CO₂. O processamento das imagens para rastreamento da motilidade celular foi realizado com o *plugin TrackMate* para o software FIJI (Image J) (Ershov *et al.*, 2022; Schindelin *et al.*, 2012).

5.3.4 Invasão Celular em Matriz de Gelatina

Placas pretas de 96 poços foram recobertas com 70 µl de gelatina conjugada com fluoresceína (0,2 mg/ml) por 30 minutos a 37 °C. Após remoção do excesso, a matriz foi condicionada com meio de cultivo completo para cada linhagem. Células MDA-MB-231 (5×10^3 células), HUVEC (3×10^3 células), HDFa (10^3 células) ou THP-1 (1×10^5 células) foram semeadas em seus respectivos meios de cultivo e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ para adesão. O meio foi substituído para *OptiMEM I Reduced Serum Medium* (Gibco) contendo EVh (10^9 partículas/ml) e as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. Controles não-tratado foram mantidos em paralelo. As células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos, lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas por 5 minutos com Triton X-100 0,1%. Após lavagens com PBS, as células foram marcadas com *Phalloidin-iFluor 647* (1:1.000, #175767, Abcam) e DAPI (0,7 ng/µl) por 20 minutos em temperatura ambiente. As células aderidas foram fotografadas no microscópio de epifluorescência *ImageXpress Micro XLS⁺* (Molecular Devices), sob aumentos de 40x e 60x. O índice de circularidade celular e a área degradada da gelatina foram avaliados no software FIJI (ImageJ), conforme descrito anteriormente (ver 4.3.6).

5.3.5 Viabilidade Celular por Resazurina

Células individuais ou em co-cultivo direto sem marcação lipofílica dos citoplasmas foram avaliadas para citotoxicidade utilizando resazurina (#199303, Sigma-Aldrich). Para tal, aplicamos 10% da solução estoque a 0,1 mg/ml nos poços da co-cultura após 20 horas do plaqueamento, retornando a placa para incubação por 4 horas adicionais a 37 °C, 5% CO₂. Em conjunto, adicionamos os controles branco, contendo 10% de resazurina em OptiMEM, e o controle 100% reduzido, preparado a partir da autoclavagem da solução utilizada para branco (121 °C, 20 minutos). Ao final, o meio foi transferido para nova placa de 96 poços e lida em fluorescência (λ_{Exc} 555 nm, λ_{Em} 585 nm) no leitor de placas *SpectraMax i3* (Molecular Devices). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de redução da resazurina com base no controle 100% reduzido.

5.3.6 Co-Cultivo Direto em Matriz de Gelatina

Poços de placas de 96 poços foram recobertas com uma fina camada de gelatina conjugada com fluoresceína (0,2 mg/ml) por 30 minutos a 37 °C. A matriz foi hidratada com OptiMEM por 30 minutos a 37 °C antes do plaqueamento simultâneo de duas linhagens dentre MDA-MB-231, HUVEC, HDFa e THP-1 (Tabela 8). O citoplasma das células foi marcado com os corantes lipofílicos CellTracker™ Red CMTPX (5 µM, C34552, Invitrogen) ou CellTrace™ CFSE (5 µM, C34554, Invitrogen) por 30 minutos a 37 °C, em meio OptiMEM. Em seguida, foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio OptiMEM para atingirem a concentração descrita abaixo (Tabela 10). As células foram tratadas com EVh (1 x 10⁹ partículas/ml) no plaqueamento e incubadas, em paralelo a um controle não-tratado (i.e., PBS), por 24 horas (Figura 23).

Tabela 10 – Detalhamento da Co-Cultura Direta

Grupo	Célula 1 – CellTracker™ Red CMTPX		Célula 2 – CellTrace™ CFSE	
	Linhagem	Concentração	Linhagem	Concentração
<i>MDA-HUVEC</i>	MDA-MB-231	2,5 x 10 ⁴ células/ml	HUVEC	2,5 x 10 ⁴ células/ml
<i>MDA-HDFa</i>	MDA-MB-231	2,5 x 10 ⁴ células/ml	HDFa	1 x 10 ⁴ células/ml
<i>MDA-THP1</i>	MDA-MB-231	2,5 x 10 ⁴ células/ml	THP-1	1 x 10 ⁵ células/ml
<i>HUVEC-HDFa</i>	HUVEC	2,5 x 10 ⁴ células/ml	HDFa	1 x 10 ⁴ células/ml
<i>HUVEC-THP1</i>	HUVEC	2,5 x 10 ⁴ células/ml	THP-1	1 x 10 ⁵ células/ml
<i>HDFa-THP1</i>	HDFa	1 x 10 ⁴ células/ml	THP-1	1 x 10 ⁵ células/ml

FONTE: Bianca C. Pachane (2024).

Figura 23 - Desenho Experimental da Co-cultura Direta

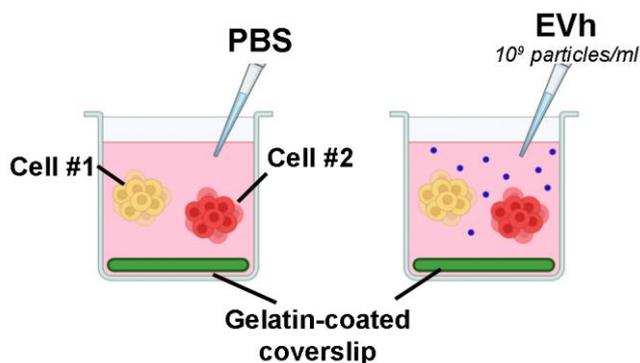


Diagrama criado em BioRender.com, demonstrando os modelos experimentais para co-cultura direta.
FONTE: Bianca C. Pachane (2024).

Para avaliação da morfologia celular e degradação da gelatina, as células foram fixadas e marcadas conforme descrito anteriormente (ver 5.3.4). A placa foi analisada por microscopia de epifluorescência no equipamento *ImageXpress Micro XLS⁺* (Molecular Devices). A área degradada da gelatina foi avaliada em aumento de 20x, conforme descrito anteriormente (ver 4.3.3.2). A morfologia celular foi inspecionada em aumento de 40x e quantificada por meio do índice de circularidade celular (ver 4.3.6). A viabilidade celular foi aferida por rezasurina ao final do tempo de incubação (ver 5.3.5).

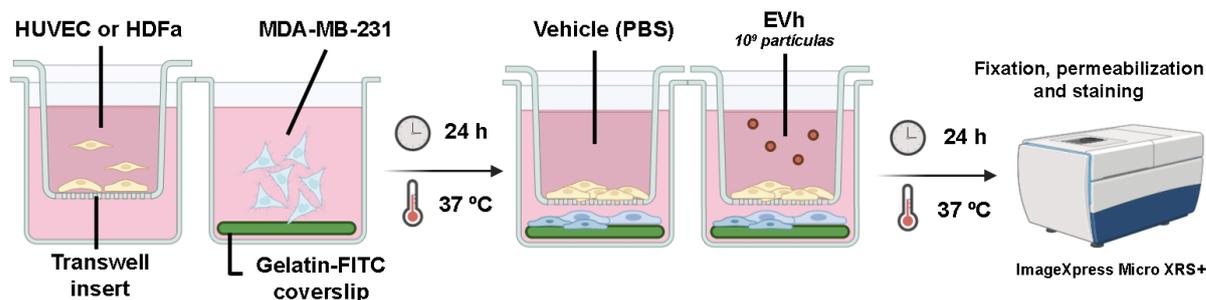
5.3.7 Co-Cultura Indireta em Câmara de Boyden

Lamínulas circulares de 13 mm foram limpas com etanol 70% e recobertas com solução de poli-L-lisina (0,1 mg/ml) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, foi realizado *cross-link* com glutaraldeído 0,5% (0,5%, v/v em H₂O) por 15 minutos no escuro. As lamínulas foram recobertas com gelatina conjugada com fluoresceína (0,2 mg/ml) por 18 horas a 4 °C, lavadas com PBS duas vezes e condicionadas com meio Leibovitz L-15 10% FBS por 30 minutos a 37 °C.

O plaqueamento celular ocorreu conforme o diagrama abaixo (Figura 24). Células MDA-MB-231 (5×10^4 células) foram incubadas nas lamínulas dispostas em placas de 24 poços com meio Leibovitz L-15 10% FBS por 24 horas a 37 °C. Concomitantemente, insertos foram preparados meio DMEM 10% FBS em placas de 24 poços, contendo 750 µl de meio na porção inferior e 250 µl de suspensão celular na porção superior. Para HUVEC, 5×10^4 células foram aplicadas em insertos com poros 3,0 µm (#353096, Corning) e, para HDFa, 1×10^4 células foram aplicadas em insertos com poros 8,0 µm (#353097, Corning). As células foram incubadas por 24 horas para adesão a 37 °C, 5% CO₂.

A câmara de Boyden foi montada em meio OptiMEM, contendo a lamínula com a célula tumoral no compartimento inferior e células endoteliais ou fibroblastos na câmara superior. O tratamento com EVh (10^9 partículas/ml) foi realizado no compartimento superior e um controle não-tratado (PBS) foi mantido em paralelo. Os sistemas foram incubados por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂.

Figura 24 – Invasão em Gelatina em Co-Cultivo Indireto



Após adesão celular nos respectivos compartimentos por 24 horas, câmaras de Boyden foram montadas e tratadas com EVh por 24 horas. Diagrama criado em BioRender.com. FONTE: Bianca C. Pachane, 2024.

O meio condicionado de ambos os compartimentos foi coletado, centrifugado a 1.200 rpm por 5 minutos e imediatamente congelados a -80 °C para avaliação da atividade gelatinase por zimografia (ver 4.3.4). As células de ambos os compartimentos foram fixadas em PFA 4% por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS. O lado de baixo das membranas foi seco com *swab* de algodão para remoção de células que possam ter passado pelos poros. As amostras coradas conforme descrito anteriormente (ver 5.3.4). As membranas foram destacadas dos inserts com bisturi para montagem em lâminas histológicas junto das lamínulas, utilizando meio específico (Fluoromount, Merck). Imagens de microscopia de epifluorescência foram adquiridas sob aumentos de 20x e 40x no equipamento *ImageXpress Micro XLS+* (Molecular Devices). A avaliação do índice de circularidade celular e área de degradação da gelatina foi realizada no software FIJI, conforme descrito anteriormente (ver 4.3.3.2 e 4.3.6).

5.3.8 Cultivo sob Fluxo – *Quasi-Vivo*

5.3.8.1 Preparo de Lamínulas com Matrizes Exógenas

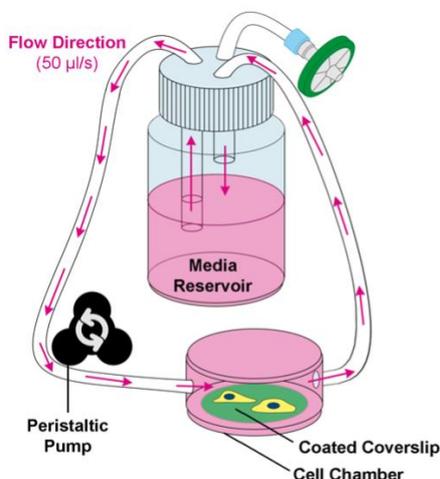
Lamínulas circulares de borossilicato com 13 mm de diâmetro foram aplicadas sobre um pedaço de Parafilm M acima de gotículas de 20 µl de poli-L-lisina (PLL, 0,1 mg/ml) por 20 minutos. Após duas lavagens com PBS, realizamos o *cross-link* com 0,5% de glutaraldeído gelado por 15 minutos, no escuro. As lamínulas foram aplicadas em recipiente estéril sob um pedaço de Parafilm M acima de gotículas de

20 μ l de Matrigel reduzido em fator de crescimento (1:1, v/v em tampão Tris-NaCl), gelatina conjugada com fluoresceína (0,2 mg/ml em PBS) ou fibronectina (1 mg/ml em PBS). Após incubação por 16-18 horas a 4 °C, protegido da luz, as lamínulas foram transferidas para placas de 24 poços, lavadas com PBS e pré-incubadas com meio de cultivo por 30 minutos a 37 °C, 5% CO₂.

5.3.8.2 Montagem do Sistema *Quasi-Vivo*

O sistema *quasi-vivo* QV500 (Kirkstall) consiste em um circuito contendo câmaras para sustentação de lamínulas circulares, conectadas entre si por um conjunto de tubos acoplados a um reservatório, que é alimentado por uma bomba peristáltica (Figura 25). Os componentes do sistema foram autoclavados e montados sob condições estéreis, fazendo uso de um filtro de seringa de 0,22 μ m em uma extremidade. Uma vez montado, o sistema foi ligado para estabelecimento do fluxo de meio de cultivo a 50 μ l/s e incubado dentro de estufa a 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas.

Figura 25 – Sistema *Quasi-Vivo*



Sistema composto de um reservatório conectado a câmaras de cultivo celular por canaletas, alimentadas por uma bomba peristáltica. FONTE: Bianca C. Pachane, 2024.

5.3.8.3 Controles Individuais da Co-Cultura sob Fluxo

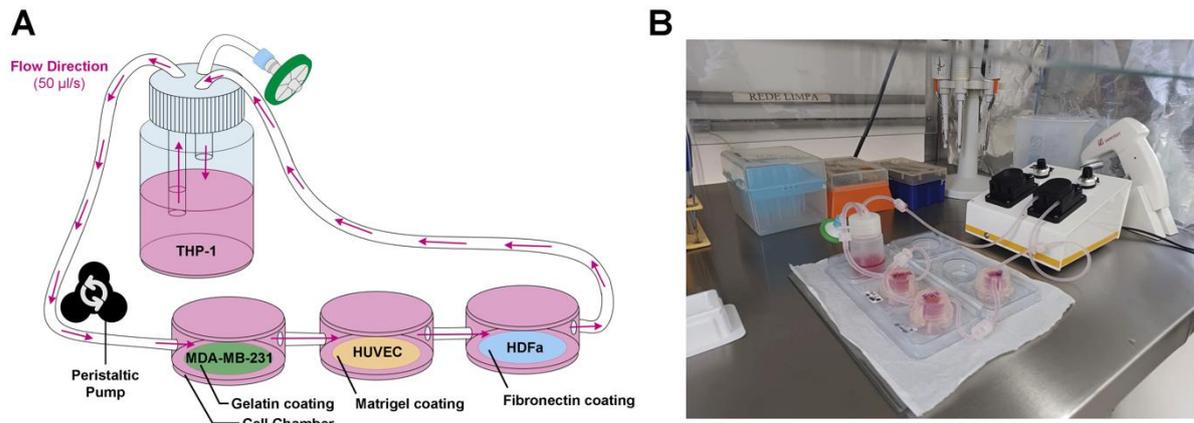
Lamínulas preparadas previamente foram semeadas com células em meio de cultivo completo para adesão por 24 horas em placa de 24 poços, a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, células MDA-MB-231 (5 x 10⁴ células/poço) aderidas em matriz de

gelatina fluorescente, HUVEC (2×10^4 células/poço) em Matrigel ou HDFa (1×10^4 células/poço) em fibronectina foram transferidas para câmaras celulares do sistema QV500 (Kirstall) e acopladas ao reservatório contendo 15 ml de OptiMEM para cultivo individual sob fluxo a $50 \mu\text{l/s}$ por 24 horas a 37°C , 5% CO_2 . Um controle individual estático foi mantido em paralelo na placa de 24 poços, em meio OptiMEM. Ao final, as células foram fixadas e coradas conforme descrito anteriormente (ver 5.3.4). As lâminas foram adquiridas em microscópio de epifluorescência sob aumento de 40x (*ImageXpress Micro XLS⁺*, Molecular Devices). A avaliação da circularidade celular e degradação da matriz de gelatina foi realizada no *software* FIJI (ver 4.3.3.2 e 4.3.6).

5.3.8.4 Co-Cultura Multicelular sob Fluxo (MC_3)

Lamínulas preparadas previamente foram semeadas com células em meio de cultivo completo para adesão por 24 horas em placa de 24 poços, a 37°C , 5% CO_2 . Em seguida, células MDA-MB-231 (5×10^4 células/poço) aderidas em matriz de gelatina fluorescente, HUVEC (2×10^4 células/poço) em Matrigel e HDFa (1×10^4 células/poço) em fibronectina foram transferidas para três câmaras celulares do sistema QV500 (Kirstall) em 1 ml de OptiMEM. Células THP-1 foram centrifugadas, ressuspendidas em meio OptiMEM e marcadas com $5 \mu\text{M}$ de CellTracker™ Red CMPTX (C34552, Invitrogen) por 30 minutos a 37°C , conforme as instruções do fabricante. Em seguida, uma suspensão contendo 1×10^5 células/ml foi preparada em 15 ml de OptiMEM no reservatório do sistema. A montagem da MC_3 foi realizada mediante orientação das câmaras conforme o desenho experimental (Figura 26) e o sistema foi testado para estabelecimento do fluxo a $50 \mu\text{l/s}$. Dois sistemas foram corridos simultaneamente, sendo um controle (PBS) e outro tratado com EVh (10^9 partículas/ml), por 24 horas a 37°C , 5% CO_2 . Ao final, as lamínulas foram submetidas à imunofluorescência (ver 5.3.9) e o meio de cultivo foi coletado e centrifugado (1.200 rpm , 5 minutos) para avaliação de citocinas por ELISA (ver 5.3.10) e de gelatinases por zimografia (ver 4.3.4). O experimento foi repetido em quatro ocasiões distintas.

Figura 26 – Co-Cultura Multicelular sob Fluxo (MC₃)



Sistema *quasi-vivo* contendo células THP-1 diluídas no reservatório com meio OptiMEM e lamínulas contendo células MDA-MB-231, HUVEC e HDFa previamente aderidas nas câmaras de cultivo. **A** – Diagrama do ensaio MC₃; **B** – Sistema QV500 montado sob condições estéreis. FONTE: Bianca C. Pachane, 2024

5.3.9 Imunofluorescência - IF

Lamínulas foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% por 5 minutos. Após lavagens, as lamínulas com HUVEC e HDFa foram bloqueadas com BSA 1% em PBS por 1 hora a 4 °C e incubadas com anticorpos primários por 18 horas a 4 °C. Para HUVEC, utilizamos anti-VEGFR2 (1:50, Rb - #39256, Abcam) e anti- β -catenin (1:50, Ms - #610154, BD Biosciences); para HDFa, utilizou-se anti-collagen II (1:50, Rb - #85266, Abcam) e anti-collagen III (1:50, #23445, Abcam). Após duas lavagens de 5 minutos com PBS, incubamos os anticorpos secundários *Goat Anti-Mouse IgG H&L (FITC)* (1:1.000, #6785, Abcam) e *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568)* (1:1.000, #175696, Abcam) por 1 hora em temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, realizamos a contramarcagem do citoesqueleto de actina com *Phalloidin-iFluor 647* (1:5.000, #176757, Abcam). As lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas histológicas com meio *Prolong Diamond Antifade Mounting Media with DAPI* (#P36962, Invitrogen) e seladas com esmalte. Imagens de microscopia de epifluorescência foram adquiridas no equipamento *ImageXpress Micro XLS+* (Molecular Devices), em aumentos de 20 e 40x. A quantificação da fluorescência foi realizada no programa FIJI (ImageJ), utilizando limites de *threshold* iguais entre os grupos.

5.3.10 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima - ELISA

A dosagem das citocinas IL-6 (555220), IL-10 (555157), TNF- α (555212) e IL1- β (557953, OptEIA, BD Biosciences) foi realizada por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima direto. Microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas por 16-18 horas. As placas foram lavadas 3 vezes (Tween 20 0,05% em PBS) e incubadas em solução bloqueadora (FBS 4% em PBS) por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagens, as amostras e a curva padrão de citocinas recombinantes foram adicionadas aos poços e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e à eles foram adicionados anticorpos anti-citocinas conjugados com peroxidase, que permaneceram por 1,5 horas em temperatura ambiente antes de cinco lavagens com Tween 20 0,05%. Adicionamos 100 μ l de solução reveladora contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico para leitura em espectrofotômetro sob O.D._{450nm} (SpectraMax i3, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais foram expressas em pg/ml.

5.3.10 Análise estatística

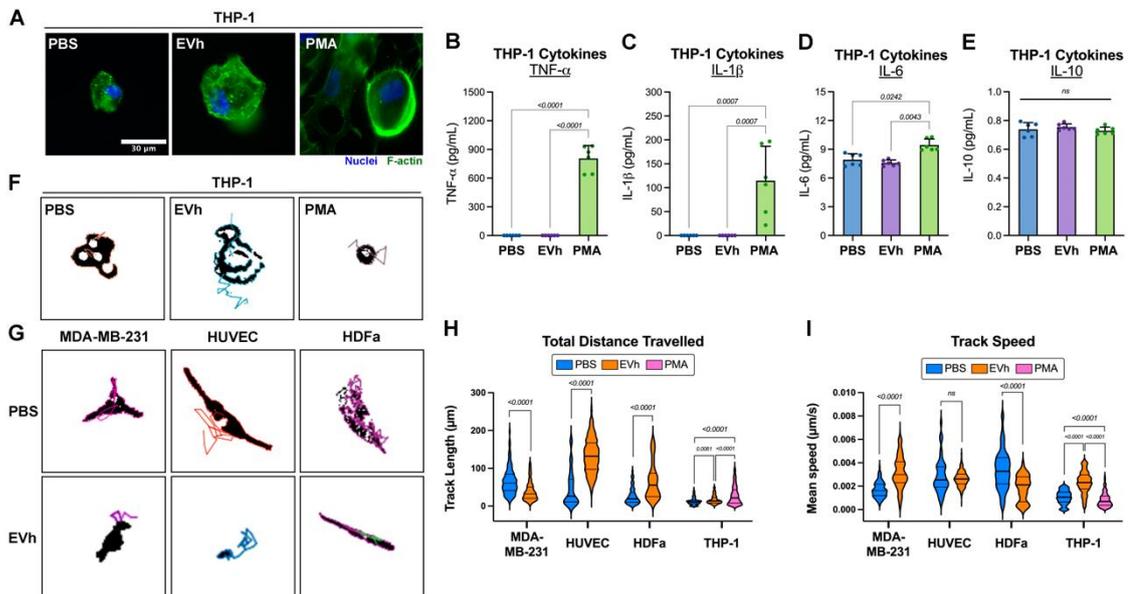
Dados foram submetidos à detecção de outliers por método ROUT e testes de normalidade de D'Agostino & Pearson omnibus K2 ($n \geq 9$) ou Shapiro-Wilk ($n < 9$) para determinação da distribuição gaussiana. Dados paramétricos foram analisados por teste t não-pareado (para 2 grupos) ou ANOVA *one-way* com teste de múltiplas comparações de Tukey (para 3+ grupos). Dados não paramétricos foram avaliados por teste de Mann-Whitney (para 2 grupos) ou pela análise de variância de Kruskal-Wallis com pós-teste de múltiplas comparações de Dunn (para 3+ grupos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente relevantes. A análise dos dados e montagem de gráficos foi realizada no *software GraphPad Prism* (v. 10.2.3).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Influência de EVh em Células do Microambiente Tumoral

Para verificar o efeito de EVh em THP-1, realizamos o comparativo com monócitos não-tratados e diferenciados com PMA em macrófagos não-polarizados (M₀) (Genin *et al.*, 2015). Ambos os tratamentos com EVh e PMA diferenciaram as células para o fenótipo aderido após 16-24 horas do tratamento, mas a morfologia dos macrófagos resultantes é divergente, sugerindo mecanismos de diferenciação distintos (Figura 27A). Obtivemos perfis diferentes de citocinas inflamatórias nos meios condicionados: TNF- α e IL-1 β foram expressos apenas no grupo PMA (Figura 27B-C), houve uma tendência não-significativa de redução da IL-6 no grupo EVh (Figura 27D) e IL-10 foi identificada de forma contínua nos três grupos tratados (Figura 27E). A polarização da motilidade das células por EVh foi identificada mas o movimento dos controles permaneceu não-direcionado (Figura 27F).

Figura 27 – Efeitos de EVh na Diferenciação de Macrófagos e na Motilidade Celular



A - Imagens de microscopia de epifluorescência de células THP-1 não-diferenciadas (PBS), diferenciadas com EVh ou PMA. Núcleos marcados com DAPI (azul) e F-actina com faloidina (verde).

B-E Quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, respectivamente. **F** - Distância total viajada por células sob microscopia em tempo real por 24 horas, em μm^2 . **G** - Velocidade média de células sob microscopia em tempo real em $\mu\text{m/s}$. **H-I** - Trajetória de células THP-1 tratadas com PBS, EVh ou PMA, e células MDA-MB-231, HUVEC ou HDFa tratadas com PBS e EVh. Barra de escala: 50 μm . Valores de *p* indicados acima das barras comparativas com significância estatística. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

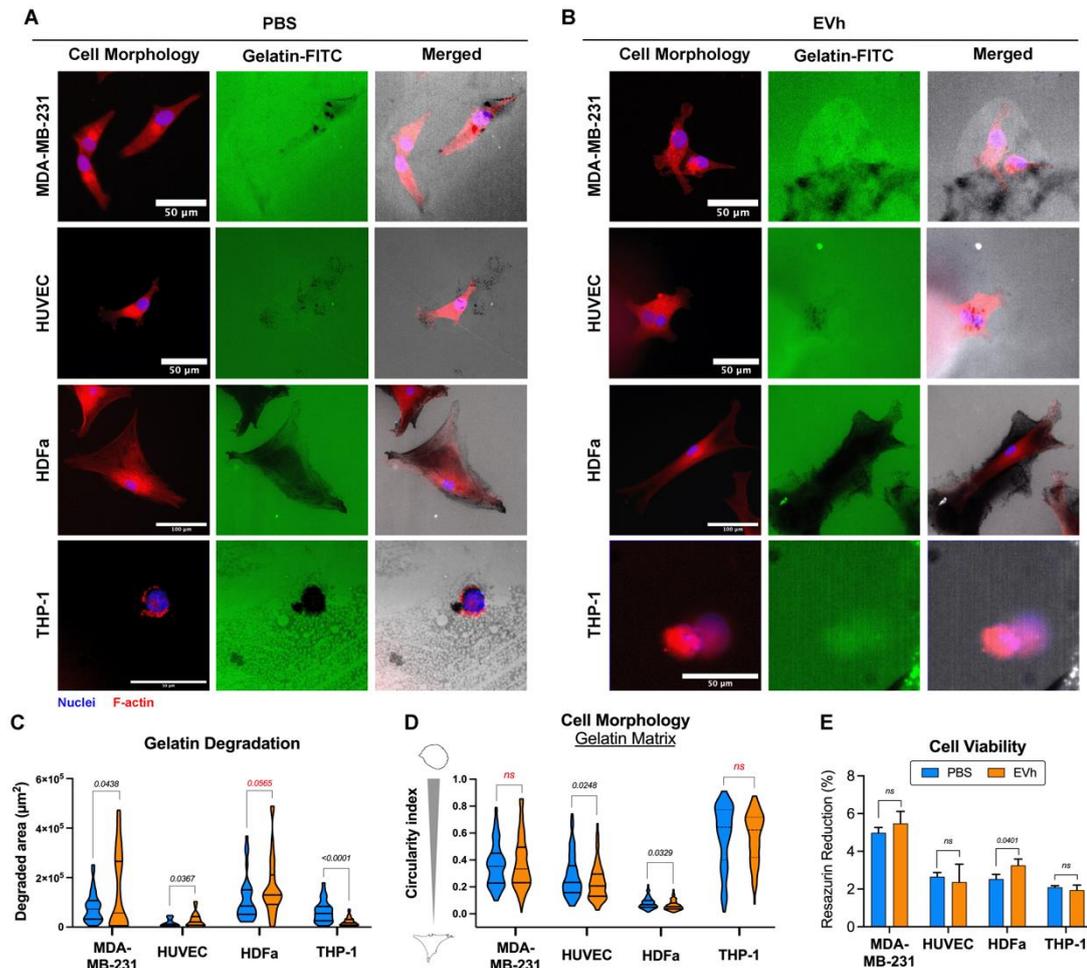
A direcionalidade do movimento por ação de EVh também foi investigada em MDA-MB-231, HUVEC e HDFa (Figura 27G). O rastreamento do movimento indicou a polarização de MDA-MB-231 e HDFa, mas o movimento de HUVEC foi similar ao controle. A distância viajada pela célula tumoral e fibroblastos foi reduzida por EVh, mas sua velocidade média aumentou, indicando trajetos mais curtos porém mais eficientes (Figura 27H-I). Em HUVEC, a velocidade média é similar entre os dois grupos, mas EVh aumenta a distância percorrida pelas células. Em THP-1, células tratadas com EVh ou PMA movimentam-se mais que o controle PBS mas a velocidade do grupo EVh foi superior aos outros.

Avaliamos a capacidade invasiva das células em matriz gelatinosa após tratamento com EVh, conforme realizado anteriormente com MDA-MB-231 (Pachane *et al.*, 2022). Todas as células foram capazes de atividade gelatinase, especialmente os fibroblastos HDFa (Figura 28A-B), sendo que o tratamento com EVh aumenta degradação por MDA-MB-231, HUVEC e HDFa mas reduz em THP-1 (Figura 28C). A morfologia de MDA-MB-231 e THP-1 não foi alterada de forma significativa por ação de EVh, mas HUVEC e HDFa tornaram-se mais alongadas (Figura 28D). A viabilidade celular das células tratadas com EVh não foi divergente ao controle, exceto nos fibroblastos HDFa, onde aumentou significativamente (Figura 28E).

5.4.2 Efeito de EVh na Co-Cultura Direta entre Células do Microambiente Tumoral

O co-cultivo direto de duas células do microambiente por vez, dentre MDA-MB-231, HUVEC, HDFa e THP-1, foi avaliado sob matriz de gelatina, comparando um controle não-tratado ao grupo exposto à EVh (Figura 29A). Conforme esperado, o fenótipo das células em co-cultivo foi diferente dos controles individuais, sendo mais pronunciado em alguns dos grupos testados, como entre MDA-HUVEC (Figura 29B). A exposição das co-culturas com EVh aumentou as adesões entre as células, sugerindo seu papel na interação entre células no microambiente tumoral, e permitiu a retomada parcial das características morfológicas originais às células avaliadas. Isso foi observado em MDA-HUVEC, HUVEC-HDFa e HDFa-THP-1. O co-cultivo de MDA-HDFa não interferiu na morfologia das células e não sofreu alterações com EVh.

Figura 28 – Modulação da Invasão Celular em Gelatina por EVh

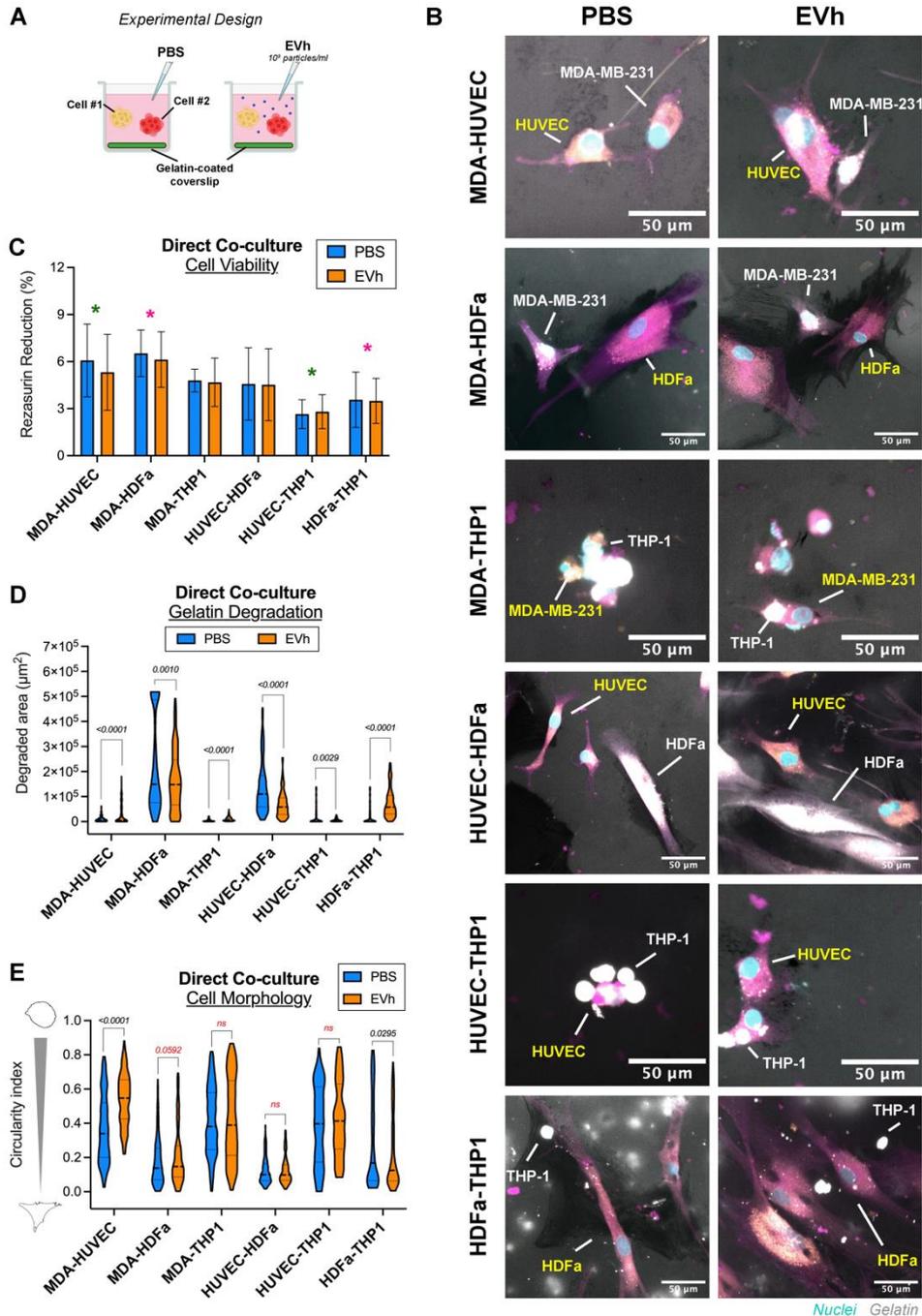


A-B - Células MDA-MB-231, HUVEC, HDFa e THP-1 tratadas com PBS ou EVh (núcleos em azul, F-actina em vermelho e gelatina em verde e cinza). Pontos de degradação em preto. **C** - Quantificação da área degradada da matriz de gelatina, em μm^2 , de células não tratadas (PBS, azul) ou tratadas com EVh (laranja). **D** - Índice de circularidade celular das quatro linhagens sob efeito de EVh. **E** - Viabilidade celular de células tratadas com EVh. Barras de escala: 50 μm e 100 μm . Valores estatisticamente relevantes de p dispostos acima das barras comparativas. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

O cultivo conjunto de THP-1 com MDA-MB-231 e com HUVEC causou grande morte das células tumoral e endotelial, evidenciada pela presença de fragmentos de F-actina pela superfície de gelatina e pela grande proporção de células THP-1 aderidas ao *coating*. Essa ação fagocítica de THP-1 foi parcialmente inibida por EVh visto que, apesar de também apresentar *debris* pela superfície matricial, ainda continha células íntegras associadas à macrófagos. A ação dos monócitos e macrófagos foi diferente em HDFa, com a adesão de THP-1 ao redor dos fibroblastos e potencial transferência de componentes entre as duas células, como evidenciado pelas partículas brancas encontradas dentro das bordas de HDFa. Neste caso, a

morfologia dos fibroblastos foi claramente afetada por EVh, tornando-se mais larga, polarizada e ramificada.

Figura 29 – Co-Cultura Direta entre Células do Microambiente Tumoral



A - Desenho experimental da co-cultura direta, criado em BioRender.com. **B** - Viabilidade celular dos co-cultivos controle (PBS, azul) e tratado (EVh, laranja). * $p > 0,05$ (verde = MDA-HUVEC x HUVEC-THP1; rosa = MDA-HDFa x HDFa-THP1). **C** - Quantificação da área degradada da matriz de gelatina sob co-cultivo. **D** - Índice de circularidade celular do co-cultivo direto. **E** - Imagens representativas das células em co-cultura na matriz de gelatina (cinza). As células foram triplamente marcadas com marcador lipofílico (CMPTX ou CSFE), faloidina (magenta) e DAPI (ciano), apresentando-se em branco ou amarelo. Barras de escala: 50 µm. Valores de p estatisticamente relevantes indicados acima das comparações. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

Os seis grupos em co-cultivo não tiveram diferenças significativas na viabilidade celular após exposição a EVh por 24 horas. Entretanto, ao comparar a viabilidade entre os grupos, verificamos que tanto HUVEC quanto HDFa são mais viáveis em co-cultivo com MDA-MB-231 que com THP-1, reforçando a ativação da ação fagocitária em macrófagos (Figura 29C).

EVh foi essencial na modulação da atividade gelatinase, favorecendo a degradação de gelatina nos co-cultivos de MDA-HUVEC, MDA-THP1 e HDFa-THP1, e reduzindo-a em MDA-HDFa, HUVEC-HDFa e HUVEC-THP1 (Figura 29D). A ação vesicular também interferiu na morfologia celular, aumentando a circularidade de MDA e HUVEC e diminuindo-a em HDFa e THP-1 (Figura 29E).

5.4.3 Ação de EVh na Invasão Celular Tumoral em Co-Cultura Indireta

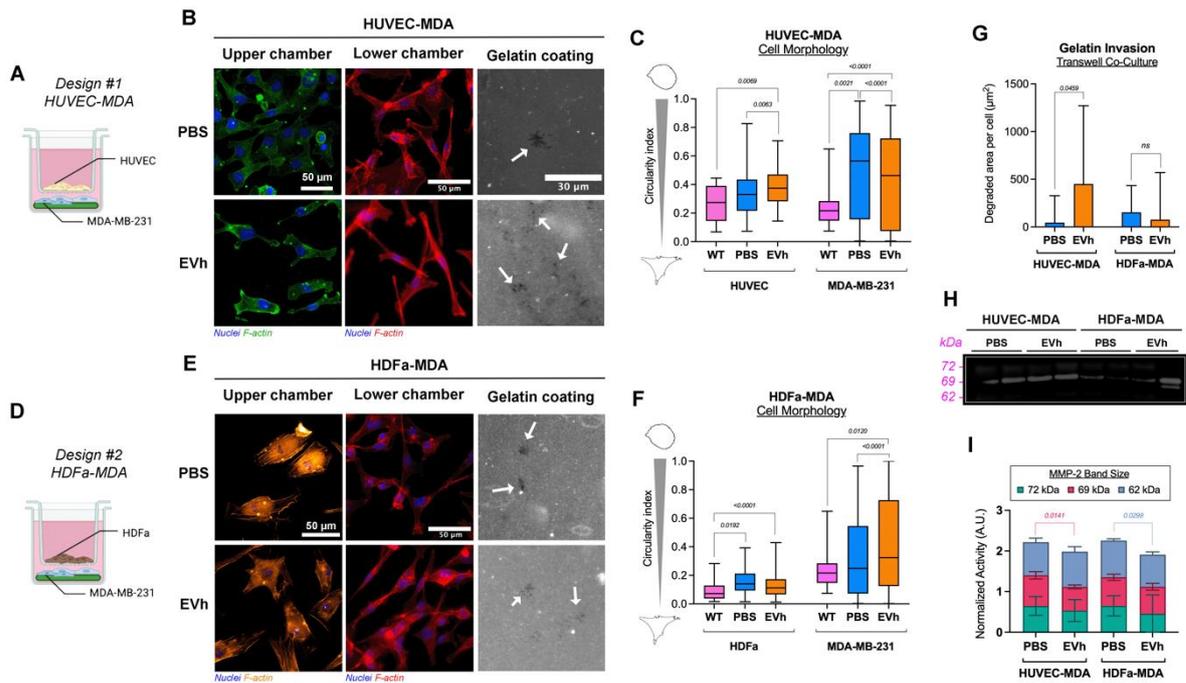
O ensaio de co-cultura indireta utilizou câmaras de Boyden com membranas que permitiram somente o compartilhamento do meio condicionado entre os compartimentos, sem que as células tivessem contato direto. Neste ensaio, avaliamos a habilidade gelatinase de MDA-MB-231 sob co-cultivo indireto com HUVEC e HDFa na presença de EVh (Figura 30A,D). Não foi possível utilizar o monócito THP-1 neste caso, visto que seu tamanho diminuto permitiu sua passagem pelos poros do inserto e inviabilizou a separação adequada dos compartimentos.

No grupo não-tratado do modelo HUVEC-MDA, as células endoteliais do compartimento superior apresentaram morfologia típica e grande interação intercelular. No compartimento inferior, as células tumorais dispunham-se claramente mais alongadas que o tradicional formato estelar, com múltiplos prolongamentos que lhe conferiam aspecto felpudo (Figura 30B). No grupo tratado com EVh, as células endoteliais perderam visivelmente as interações intercelulares, apresentando bordas arredondadas, e as células tumorais perderam seu aspecto felpudo. Essas alterações foram refletidas no índice de circularidade, que aumentou em HUVEC e MDA especialmente após exposição à EVh (Figura 30C).

No modelo HDFa-MDA, a ação da co-cultura indireta foi o suficiente para reduzir a amplitude dos fibroblastos, tornando-as mais largas que o controle individual. Entretanto, o fenótipo das células estromais não sofreu alterações mais significativas após exposição à EVh (Figura 30E). As células tumorais apresentaram seu fenótipo

característico no controle não-tratado, mas apresentou diferença após tratamento com EVh. A circularidade celular corroborou essas observações, inferindo que EVh não influencia diretamente na morfologia de fibroblastos, mas pode alterar o comportamento fenotípico das células tumorais (Figura 30F).

Figura 30 – Co-Cultura Indireta em Câmara de Boyden de Células do TME



A - Desenho experimental de HUVEC-MDA criado em BioRender.com. **B** - Imagens de células HUVEC (verde) e MDA-MB-231 (vermelho) em co-cultura indireta. Núcleos marcados com DAPI (azul), F-actina com faloidina e gelatina com fluoresceína (cinza). Pontos de degradação da matriz indicados com setas brancas. **C** - Circularidade celular da co-cultura indireta de HUVEC e MDA-MB-231, considerando células controle (WT, magenta), em co-cultura não tratada (PBS, azul) e tratada com EVh (laranja). **D** - Desenho experimental de HDFa-MDA criado em BioRender.com. **E** - Imagens representativas de células HDFa (laranja) e MDA-MB-231 (vermelho). **F** - Circularidade celular da co-cultura indireta de HDFa e MDA-MB-231. **G** - Área degradada da matriz de gelatina por MDA-MB-231 sob co-cultura indireta. **H** - Zimograma identificando MMP-2 no meio condicionado das co-culturas indiretas. **I** - Quantificação da densitometria dos zimogramas, indicando a atividade das gelatinases MMP-2. Barras de escala: 50 μ m. Valores estatisticamente relevantes de *p* dispostos acima das barras comparativas. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

A degradação da matriz gelatinosa ocorreu em todas as condições testadas com o perfil típico para MDA-MB-231, através de pontos de desgaste focal (Figura 30B,E). A área degradada por MDA em co-cultivo com HUVEC é aumentada estatisticamente no grupo EVh em relação a seu controle, mas não há diferenças na atividade invasiva de MDA sob cultivo conjunto com HDFa (Figura 28G). Por zimografia em gelatina, apenas MMP-2 foi encontrada, demonstrando bandas em 72,

69 e 62 kDa condizentes com pró-MMP2, MMP-2 intermediária e MMP-2 ativa (Figura 30H). A densitometria dos zimogramas indicou que EVh reduz a expressão de MMP-2 intermediária cultura de HUVEC-MDA e de MMP-2 ativa na cultura de HDFa-MDA (Figura 30I).

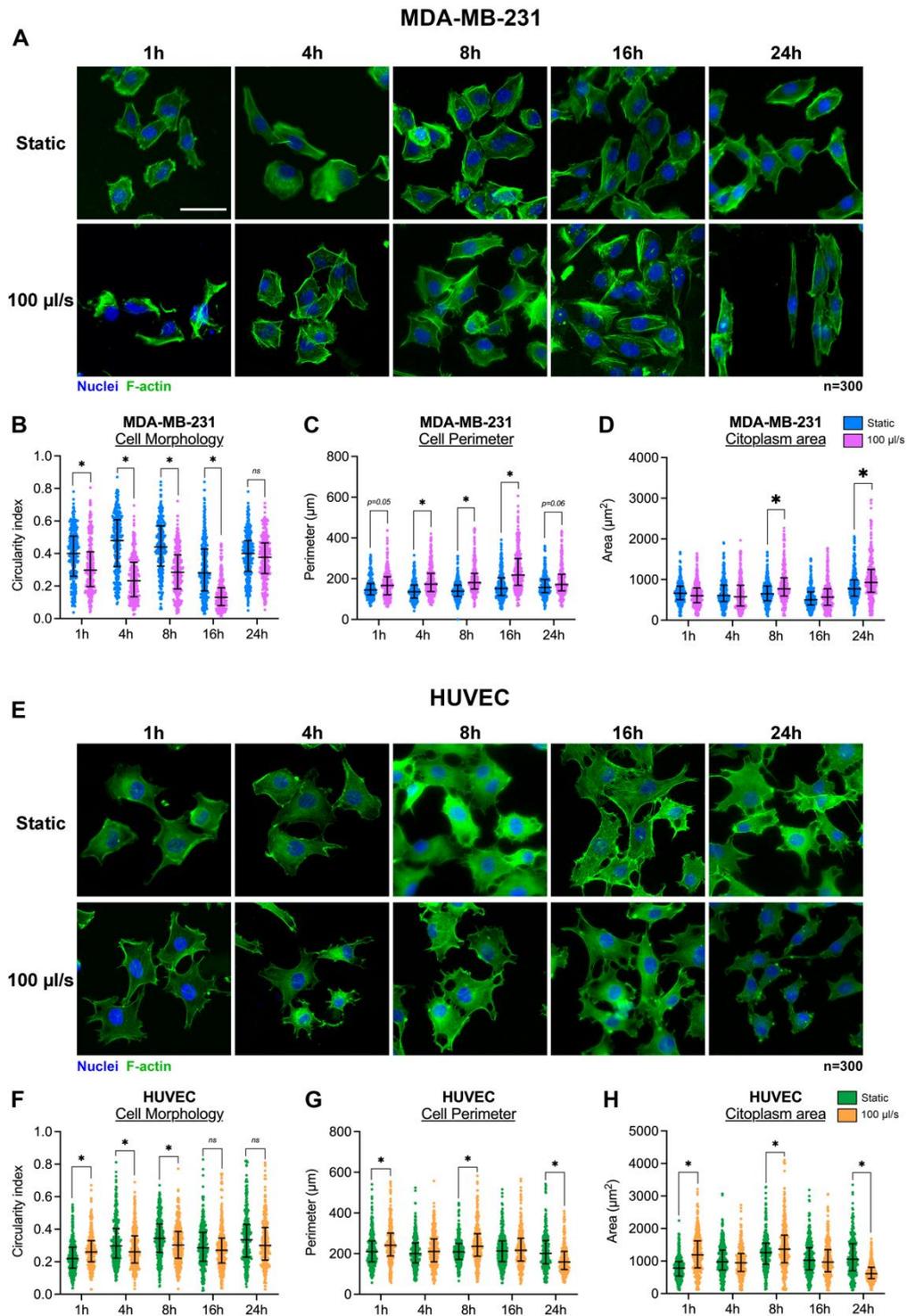
5.4.4 Co-Cultura Sob Fluxo Como Modelo de Estudo do Microambiente Tumoral

Antes do início dos testes em co-cultivo, o sistema *quasi-vivo* (QV) passou por uma etapa de padronização para avaliação da resistência celular à força de cisalhamento. Avaliamos que o fluxo de 100 $\mu\text{l/s}$ era suficiente para HUVECs, possivelmente por sua função de estruturação de capilares sanguíneos, mas este demonstrou-se agressivo para MDA-MB-231 (Figura 31A-B). A quantificação dos parâmetros morfológicos indicou que as células passam por uma fase de adaptação ao fluxo até 16 horas, estabilizando seu fenótipo após 24 horas. Portanto, para co-cultura multicelular circulante (MC₃), reduzimos o fluxo de 50 $\mu\text{l/s}$ e estabelecemos a incubação por 24 horas.

Neste modelo, utilizamos células suspensas THP-1 e avaliamos seu local preferencial de adesão, comparando os fenótipos celulares com os controles circulantes individuais (Figura 32A-B). A maior parte dos macrófagos foi identificado junto de MDA-MB-231 (Figura 32C), mas resíduos de células foram encontradas em todas as lamínulas, possivelmente resultantes da ação fagocitária de THP-1. Nos controles circulantes individuais, o fluxo de 50 $\mu\text{l/s}$ não gerou resíduos citoplasmáticos e nucleares como os encontrados na co-cultura multicelular. Imagens do controle circulante individual de THP-1 não foram obtidas pois o monócito não se diferenciou em testes com duas matrizes distintas.

As células TNBC MDA-MB-231 foram avaliadas para sua morfologia e invasão em gelatina. O co-cultivo multicelular com EVh aumentou sua sobrevivência, visto que poucas células do grupo controle se mantiveram com citoplasma e/ou núcleo íntegro (Figura 32D). A plasticidade morfológica celular foi corroborada por seu índice de circularidade, no qual o fenótipo mais alongado foi encontrado no MC₃-EVh e o mais circular, em cultivo estático individual (Figura 32E). Houve redução da degradação da matriz de gelatina por MDA-MB-231 sob fluxo, mas o grupo EVh apresentou maior índice dentre as condições circulantes (Figura 32F).

Figura 31 – Padronização do Cultivo Celular sob Fluxo



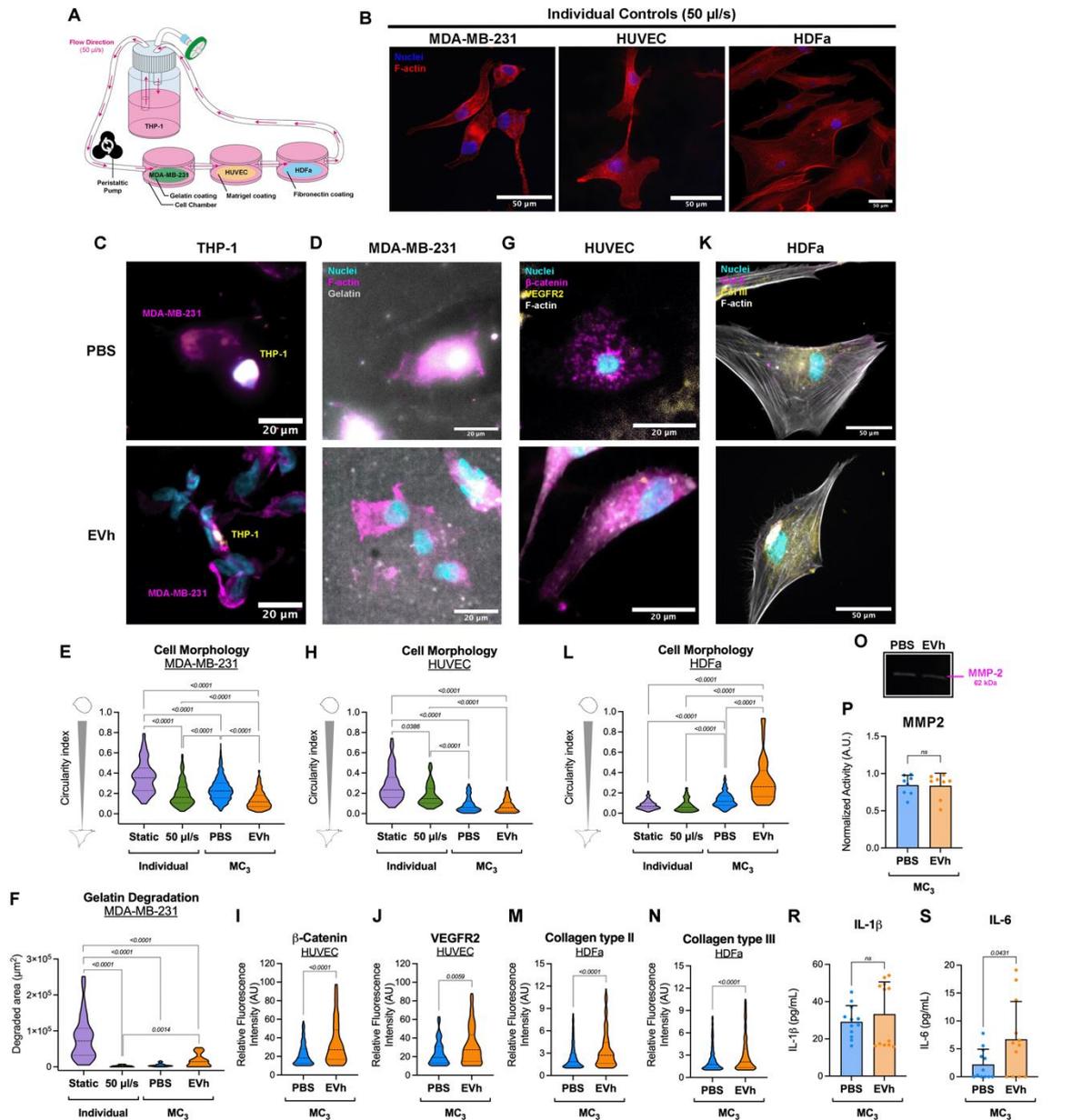
A - Imagens de MDA-MB-231 (núcleo em azul, F-actina em verde) cultivadas em modelo estático ou sob fluxo (100 µl/s) por 1, 4, 8, 16 e 24 horas. Barra de escala: 50 µm. **B** - Índice de circularidade de MDA-MB-231 sob cultivo estático (azul) ou sob fluxo (magenta). **C** - Perímetro celular de MDA-MB-231 em µm. **D** - Área celular de MDA-MB-231 em µm². **E** - Imagens de HUVEC cultivadas em modelo estático ou sob fluxo por 1, 4, 8, 16 e 24 horas. **F** - Índice de circularidade de HUVEC sob cultivo estático (verde) ou sob fluxo (amarelo). **G** - Perímetro celular de HUVEC em µm. **H** - Área celular de HUVEC em µm². * $p < 0,05$. FONTE: Bianca C. Pachane e Ana Carolina C. Nunes, 2022.

Células endoteliais HUVEC foram apuradas para morfologia e expressão dos marcadores β -catenina e VEGFR2, que estão envolvidos nas junções intercelulares e início da cascata angiogênica. Como em MDA-MB-231, a integridade celular foi comprometida no MC₃ controle, mas o fenótipo celular íntegro foi retomado por EVh, confirmando a importância desse componente na proteção e manutenção do TME (Figura 32H). Houve aumento significativo da expressão de β -catenina e VEGFR2 na co-cultura tratada com EVh, sugerindo sua influência em vias de adesão e angiogênese tumoral (Figura 32I-J).

Investigamos os fibroblastos HDFa para sua morfologia e secreção de matriz dos colágenos tipo II e III. A integridade dessas células foi a mais bem mantida dentre as duas condições de MC₃, com diferenças morfológicas sutis (Figura 32K). A circularidade de HDFa sob efeito de EVh foi maior dentre todas as condições testadas (Figura 32L) e a expressão de ambos os colágenos tipo II e III foi aumentada, mas contida majoritariamente ao interior das células (Figura 32M-N).

O meio condicionado do co-cultivo circulante foi avaliado para gelatinases por zimografia e para citocinas por ELISA. No zimograma, identificamos apenas a presença de MMP-2 ativa (62 kDa) (Figura 32O). A densitometria das bandas não identificou diferença na expressão da gelatinase pelo sistema (Figura 32P). Por ELISA, não foi identificada diferença estatística em IL-1 β , mas aumento significativo de IL-6 no grupo tratado com EVh (Figura 32R-Q).

Figura 32 – Avaliação da Co-Cultura Multicelular Circulante



A – Modelo de co-cultura multicelular sob fluxo. **B** - Controles individuais de MDA-MB-231, HUVEC e HDFa sob fluxo (50 µl/s; núcleo em azul, F-actina em vermelho). **C** - Imagens de THP-1 (CMPTX, amarelo) aderidas na câmara de MDA-MB-231 (núcleos em ciano, F-actina em magenta). **D** - Células MDA-MB-231 em matriz de gelatina (cinza) no co-cultivo multicelular, com pontos de degradação em preto. **E** - Índice de circularidade celular de MDA-MB-231 sob cultivo individual estático (static, roxo) e circulante (50 µl/s, verde), e co-cultivo multicelular (MC₃ PBS, azul) com EVh (MC₃ EVh, laranja). **F** - Área degradada da matriz de gelatina por MDA-MB-231. **G** - Células HUVEC no co-cultivo multicelular (núcleos em ciano, β-catenina em rosa, VEGFR2 em amarelo e F-actina em cinza). **H** - Índice de circularidade de HUVEC em cultivo individual e em co-cultivo. **I** - Fluorescência relativa de β-catenina em HUVEC. **J** - Fluorescência relativa de VEGFR2 em HUVEC. **K** - Imagens de HDFa em co-cultivo multicelular (núcleos em ciano, colágeno tipo II em magenta, colágeno tipo III em amarelo e F-actina em cinza). **L** - Índice de circularidade de HDFa em cultivo individual e co-cultivo. **M** - Fluorescência relativa do colágeno tipo II em HDFa. **N** - Fluorescência relativa do colágeno tipo III em HDFa. **O-P** - Zimograma do meio condicionado do MC₃ e sua densitometria para MMP-2. **Q-R** - Níveis de IL-1β e IL-6 do meio condicionado do MC₃. Valores estatisticamente relevantes de *p* dispostos acima das comparações. Barras de escala: 20 µm e 50 µm. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

5.5 DISCUSSÃO

Anteriormente, verificamos que EVs separadas de células TNBC em hipóxia promovem uma autossinalização pró-invasiva sob condições ótimas de oxigênio (Pachane *et al.*, 2022). Considerando que o tecido tumoral apresenta outros componentes além da célula neoplásica, é importante determinarmos a resposta promovida por EVh em células do microambiente tumoral de mama. Entretanto, o estudo do TME *in vitro* é desafiador devido a limitações metodológicas, práticas e tecnológicas. O desenvolvimento recente de técnicas como co-culturas multicelulares e cultivo 3D permitiu elevar o nível de complexidade no qual hoje podemos investigar mecanismos básicos *in vitro*, sendo que ambas as técnicas também podem ser combinadas na geração de esferoides derivados de co-cultivo multicelular em 3D (Casali *et al.*, 2024; Park *et al.*, 2022; Rebelo *et al.*, 2018). Entretanto, uma limitação importante com o estudo de esferoides é a dificuldade de investigar o comportamento de células individualizadas dentre a massa cultivada. Na tentativa de manter a complexidade do TME e promover a análise individualizada de cada componente celular, neste estudo desenvolvemos um novo método de avaliação do TME *in vitro*, o co-cultivo multicelular circulante (MC₃).

Para validar o sistema, primeiramente foi necessário verificar as respostas individualizadas e pareadas dos componentes celulares e do tratamento com EVh. Dessa forma, utilizamos três métodos de co-cultura (direta, indireta e MC₃) junto de ensaios individuais (estáticos e circulantes) para determinar as respostas basais de cada combinação, visando compreender (1) o papel de EVh em cada tipo celular, em comportamentos referentes à invasão tumoral e metástase; (2) a importância do contato direto entre as células para o desempenho de funções celulares; e (3) a influência do fluxo nas respostas celulares. De forma geral, verificamos que (1) EVh atua de forma diferente em cada tipo celular; (2) a interação das células muda conforme o tipo de interação que elas apresentam; e (3) células tumorais costumam ser mais sensíveis à força de cisalhamento que células endoteliais e fibroblastos, de forma que o fluxo do MC₃ precisou ser ajustado para evitar artefatos de técnica.

Em cada componente celular do TME, o tratamento com EVh gerou respostas distintas. Em TNBC, complementamos resultados anteriores ao confirmar que EVh altera a direcionalidade do movimento da célula tumoral, tornando seu percurso mais eficiente. Além disso, observamos um sutil aumento da viabilidade de

células tumorais sob tratamento com EVh, reforçando a possível ativação de vias metabólicas conforme indicado anteriormente (Pachane *et al.*, 2022). Células endoteliais apresentaram aumento da migração e degradação de matriz gelatinosa com favorecimento de fenótipo mesenquimal sob ação de EVh, caracterizando a promoção de comportamentos pró-invasivos. Em fibroblastos, EVh auxiliou na direcionalidade da migração celular e promoveu aumento de viabilidade celular, mas não influenciou na invasão tumoral – de forma surpreendente, visto que uma das principais funções de fibroblastos é a remodelação da ECM (Visser; Joyce, 2023).

Contudo, dentre todas as células, monócitos foram os mais susceptíveis à ação de EVh. O tratamento com EVh diferenciou uma população de monócitos em macrófagos com fenótipo diferente do controle PMA. A análise de citocinas indicou uma sutil redução de IL-6 e baixa expressão de IL-10, que são condizentes com o fenótipo M2 (Jayasingam *et al.*, 2020; Kartikasari *et al.*, 2021; Yeh *et al.*, 2016; Yunna *et al.*, 2020). Em contrapartida, o controle positivo de diferenciação, realizado com PMA, favoreceu o perfil pró-inflamatório M1 (Jayasingam *et al.*, 2020; Kartikasari *et al.*, 2021; Yeh *et al.*, 2016; Yunna *et al.*, 2020). Em cultivo individual, os macrófagos diferenciados por EVh tiveram migração direcionada e redução significativa da atividade gelatinase em comparação ao controle diferenciado por PMA, reforçando os fenótipos M2 e M1, respectivamente, de cada tratamento (Genin *et al.*, 2015).

Em co-cultura direta e MC₃, a ação de EVh foi similar ao encontrado em cultivo individual. Observamos que EVh apresenta um papel protetivo ao TME, evitando a degradação fagocítica por macrófagos e permitindo que as outras células do TME retomem seu fenótipo original. Esses resultados reforçam a hipótese que EVh é essencial na polarização de macrófagos associados ao tumor (TAM) para o fenótipo M2. Esse tipo de TAM não apresenta um mecanismo específico de ativação, mas sugere-se que é dependente do estímulo por citocinas incluindo TGF- β , IL-4, IL-13, IL-10 e M-CSF (Genin *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2024). O TAM M2-símile é capaz de secretar MMPs e componentes autócrinos da ECM, auxiliando na adesão celular, além de secretar VEGF, Arg-1, PDGF e IGF, favorecendo a angiogênese, proliferação celular e recuperação tecidual (Wang *et al.*, 2024). Em contrapartida, a formação de TAMs M1-símile requer estímulo de IFN, CSF e TNF- α , que age diretamente nos fatores NF- κ B e IRF3, resultando na apresentação de antígenos de forma exacerbada e na secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias (Wang *et al.*, 2024).

Sendo o TAM M2-símile promotor da angiogênese tumoral, voltamos a atenção aos resultados obtidos com as células endoteliais sob co-cultura. De forma geral, células endoteliais sofrem grande alteração fenotípica junto de células tumorais, promovendo invasão celular e alterações morfológicas em co-cultura direta e indireta. O tratamento com EVh em células com contato direto retomou o fenótipo celular original, mas em contato indireto gerou a perda das interações intercelulares entre as células endoteliais. As junções intercelulares são cruciais para a manutenção da integridade do endotélio e dependem da função de múltiplas proteínas, especialmente da VE-caderina (Duong; Vestweber, 2020). Com expressão quase exclusiva no endotélio vascular, a VE caderina é ligada intracelularmente à β -catenina, que conecta-se diretamente ao citoesqueleto (Dejana, 2004; Guo *et al.*, 2008). Não foi possível identificar, no ensaio de co-cultura indireta, quais moléculas adesivas estavam sendo influenciadas por EVh, mas em MC₃ houve aumento da expressão de β -catenina em HUVECs. Estes resultados conflitantes sugerem que o microambiente tumoral seja essencial para a manutenção das adesões intercelulares endoteliais, mas testes adicionais são necessários para investigar esse comportamento. Ademais, sugerimos que ação disruptiva de EVh na adesão entre células endoteliais seja uma consequência do aumento da invasão celular promovida por elas.

Além da influência nas interações entre células, EVh também aumentou a expressão de VEGFR2 em células endoteliais sob MC₃. O VEGFR2 é o principal receptor pró-angiogênico de VEGF, que apresenta intrínseca relação a outros receptores de membrana como a integrina $\alpha v \beta 3$ (Danilucci *et al.*, 2019). Considerando que a polarização de TAM M2-símile promove a secreção de VEGF, é possível que o aumento na expressão proteica de VEGFR2 seja consequência desse processo (Wang *et al.*, 2024). Ademais, a retomada do fenótipo original de HUVECs sob tratamento com EVh pode ser decorrente do aumento da sinalização para mobilização de proteínas adesivas, que ocorre mediante *cross-talk* com VEGFR2 e interfere diretamente no citoesqueleto de actina (Danilucci *et al.*, 2019). Estudos posteriores são necessários para investigar essas suposições.

No caso de fibroblastos, a resposta mediada por EVh foi peculiar. Os ensaios individuais sugeriram que apenas a viabilidade das células foi aumentada por tratamento com EVh, e em co-cultura direta sua morfologia foi levemente alterada sob contato com macrófagos apenas. Em co-cultura indireta, a degradação da gelatina por

células tumorais foi reduzida por fibroblastos expostos à EVh. No geral, os fibroblastos demonstraram-se insensíveis à muitas das condições testadas, o que condiz com sua função: fibroblastos são células de suporte estrutural, e podem se associar a tumores mediante sinalização prolongada da inflamação associada ao tumor (TAI), transformando-se em CAFs (Kennel *et al.*, 2023). A TAI é sustentada pelo contínuo crescimento da massa tumoral e hipóxia, que já foi descrita como fator determinante do fenótipo inflamatório de fibroblastos em câncer pancreático (Mello *et al.*, 2022). Vimos que fibroblastos não foram tão susceptíveis a EVh quanto aos outros componentes celulares do TME, visto que o contato direto ou indireto com outras células nos trouxe resultados mais expressivos. Mesmo assim, EVh aumenta a atividade celular e modifica sutilmente a morfologia de HDFa, promovendo a síntese de colágeno tipo II e tipo III sob co-cultura circulante multicelular. Ambos os colágenos são fibrilares e estão associados ao aumento da rigidez da ECM, fator crucial para a metástase (Winkler *et al.*, 2020)

O uso do sistema *quasi-vivo* para formação da MC₃ nos permitiu investigar de forma individual todos os componentes celulares de interesse, enquanto avaliamos concomitantemente citocinas e enzimas do meio circulante por todas as câmaras do TME. Tivemos níveis aumentados de IL-6 com EVh, citocina cuja superexpressão está intimamente relacionada com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores, na regulação da fase aguda da inflamação e na modulação de linfócitos T e B (Weng *et al.*, 2019). Além disso, altos níveis de IL-6 e IL-1 β favorecem o fenótipo inflamatório de CAFs (Kennel *et al.*, 2023). Em nosso sistema, não vimos diferença estatística nos níveis de IL-1 β , mas há uma tendência de aumento, sugerindo a diferenciação dos fibroblastos em CAFs. Além disso, o comportamento dos macrófagos foi condizente com os resultados anteriores, promovendo ações anti-tumorais sob o grupo MC₃ controle e sendo pró-tumoral após exposição à EVh.

Em suma, o uso do método MC₃ nos permitiu investigar, de forma simples, as dinâmicas de um microambiente tumoral *in vitro*, tendo como limitações a quantidade de câmaras disponíveis para co-cultivo, a força de cisalhamento do fluxo e a falta de contato direto entre as câmaras, o que reduz nossa capacidade de avaliar certas respostas celulares. Este modelo, anteriormente utilizado para estudo da barreira hematoencefálica, também tem potencial para ensaios de adesão sob fluxo e para o estudo de células tumorais circulantes, dentre outras possibilidades (Miranda-Azpiazu *et al.*, 2018). Diferentemente de co-culturas 3D multicelulares, neste modelo

podemos investigar respostas em células individualizadas sem o uso de técnicas mais refinadas, tornando o método mais viável (Dey *et al.*, 2021).

5.6 CONCLUSÃO

EVh promove alterações em células do microambiente tumoral, promovendo a diferenciação de macrófagos M2, direcionando a motilidade de células TNBC, induzindo a invasão direcionada em células endoteliais e aumentando a atividade celular de fibroblastos. Utilizando três métodos complementares de co-cultura, verificamos que a ação efetora de EVh no microambiente tumoral depende do tipo celular afetado, e que fibroblastos respondem mais efetivamente aos componentes do TME em conjunto que individualmente. Em co-cultivo multicelular circulante, um novo método para estudo do TME *in vitro*, confirmamos o efeito pró-tumoral dos macrófagos M2 diferenciados por EVh, o princípio da polarização de fibroblastos em CAFs, a promoção da sinalização para angiogênese e o favorecimento da sobrevivência tumoral. Nossos resultados sugerem que EVh é essencial para a remodelação do TME, tornando-o favorável para o desenvolvimento tumoral.

CAPÍTULO 6 – ASSOCIAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO

6.1 INTRODUÇÃO

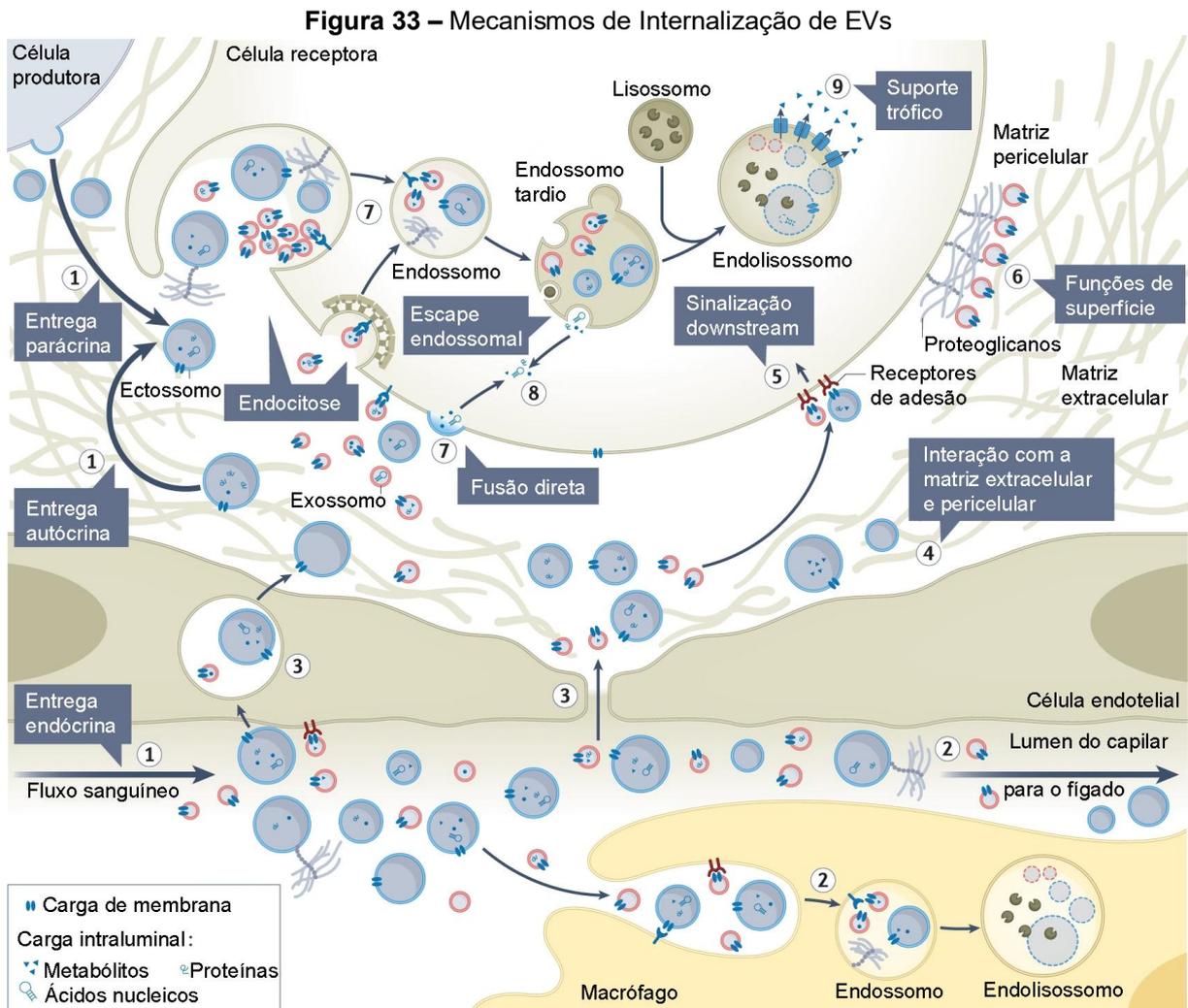
A habilidade fundamental de adesão de EVs pode modular diversos comportamentos celulares, tanto na superfície ou intracelularmente através da entrega de seu conteúdo bioativo (van Niel *et al.*, 2022). Discutimos anteriormente como EVs associadas à superfície celular auxiliam na movimentação e adesão celular à ECM (Altei *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2020). A internalização do conteúdo funcional de EVs pode acarretar em mudanças na sinalização celular, metabolismo e expressão gênica, o que gera grande interesse quanto a seu potencial terapêutico (Mulcahy; Pink; Carter, 2014).

O processo de internalização ou *uptake* é composto de quatro etapas fundamentais. As partículas se associam à membranas por meio de proteínas de adesão como tetraspaninas, integrinas, imunoglobulinas, lectinas e proteoglicanos, dentre outras (Mulcahy; Pink; Carter, 2014). A interação superficial entre partículas e células não implica necessariamente sua incorporação ao ambiente intracelular, podendo se prolongar por tempo indeterminado (van Niel *et al.*, 2022). Caso a EV seja reconhecida pela célula, ela pode ser internalizada por meio de diversos mecanismos, que serão detalhados a seguir. Após sua internalização, o conteúdo vesicular é liberado dentro da célula e o restante da partícula pode ser levado ao lisossomo para degradação ou ao endossomo para reciclagem (Mathieu *et al.*, 2019) (Figura 33).

As rotas de internalização de EVs em células aceptoras ocorrem majoritariamente por endocitose, podendo ser facilitada por diferentes proteínas, ou por fusão direta pela membrana plasmática (Mulcahy; Pink; Carter, 2014). Dentre os mecanismos de endocitose, o mais comum é mediado por clatrina, proteínas triméricas compostas por três cadeias pesadas ligadas à uma cadeia leve cada, formando um arcabouço geométrico que recobre as vesículas e possibilita a formação da estrutura de actina que direciona sua entrega ao aparato golgiano ou à via endossomal (Kirchhausen; Owen; Harrison, 2014).

Entretanto, existem outras rotas independentes de clatrina, dentre as quais a endocitose dependente de caveolina é a mais estudada. A caveolina é uma

estrutura interna à membrana plasmática que forma covas mediante interação entre proteínas, especialmente CAV1, e microdomínios lipídicos que puxam o conteúdo da superfície (Mulcahy; Pink; Carter, 2014; Parton; del Pozo, 2013). A vesícula é fusionada com o endossomo primário e pode ser reciclada, ou associa-se aos corpos multivesiculares e segue para a via de ubiquitinação (Parton; del Pozo, 2013).



Outra via endocítica independente de clatrina é a macropinocitose, onde a membrana plasmática é invaginada e forma pregas responsáveis pela coleta de fluídos extracelulares ao redor da partícula de interesse (Mulcahy; Pink; Carter, 2014). A macropinocitose é dependente da polimerização de filamentos de actina após a sinalização pelo lipídio PIP3, gerando uma protuberância na superfície celular que encapsula a região de interesse (Kay, 2021). Devido à mobilização da membrana

necessária para este mecanismo, apenas partículas de pequeno tamanho podem ser internalizada dessa forma (Mathieu *et al.*, 2019).

A entrega do conteúdo vesicular à células alvo tem grande potencial terapêutico, mas esbarra em limitações metodológicas como o desconhecimento sobre a biodistribuição de EVs em organismos complexos (Driedonks *et al.*, 2022). Os poucos estudos sobre biodistribuição de EVs são majoritariamente realizados em modelos murinos, utilizando técnicas *in vivo*, *in situ* e *ex vivo* para identificar a dispersão de diferentes espécies de EVs em órgãos de interesse, especialmente no pulmão, fígado, baço e rins (Kang *et al.*, 2021; Wiklander *et al.*, 2015). Recentemente, um estudo com primatas não-humanos (NHP) verificou que a administração intravenosa de EVs com potencial biotecnológico foi detectada sob associação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), particularmente em células B (Driedonks *et al.*, 2022). Resultados similares foram encontrados em um modelo *ex vivo*, utilizando amostras de sangue total de NHP que geraram um modelo viável para estudo de interações entre EVs e componentes sanguíneos (Rodriguez *et al.*, 2023). Neste capítulo, descrevemos o estudo das interações entre EVs e células B, investigando o tipo de internalização e a transposição dos resultados obtidos em NHP para humanos. Os resultados obtidos estão sendo preparados em manuscrito para publicação em periódico internacional.

6.2 OBJETIVOS

Investigar as propriedades moleculares do tropismo de EVs para linfócitos B em sangue de doadores primatas não-humanos e humanos.

6.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o tipo de interação entre linfócitos B e EVs em modelo *ex vivo*;
- Investigar a conservação do mecanismo de interação de EVs em células B entre primatas e humanos;
- Identificar a reprodutibilidade de resultados *ex vivo* em ensaios *in vitro*.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Obtenção de Sangue Total de Primatas e Humanos

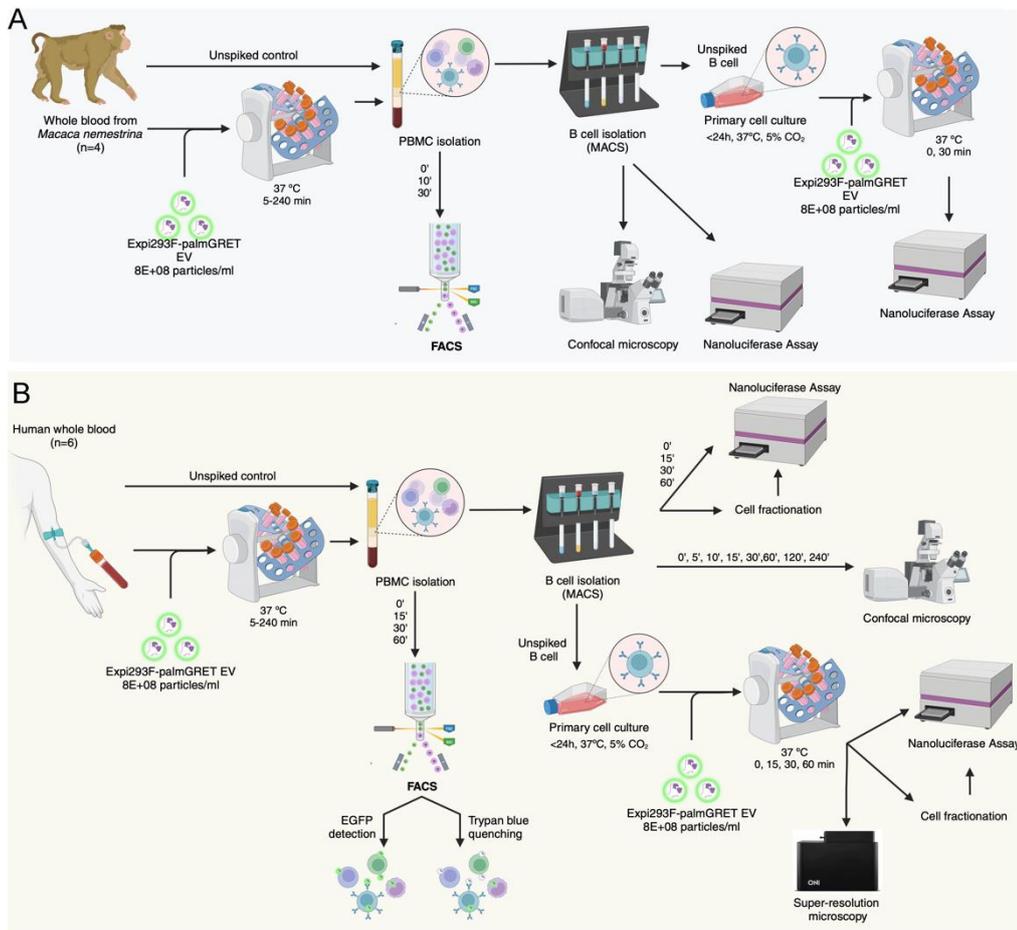
Conforme metodologia publicada anteriormente (Rodriguez *et al.*, 2023), amostras de sangue total de primatas não-humanos (NHP, *Macaca nemestrina*) foram coletadas por punção venosa com seringas estéreis com trava Luer (#309653, BD Biosciences) e misturadas ao anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose, 5:1 (v/v) em água deionizada). O sangue foi processado dentro de 1 hora da coleta. Os procedimentos com sangue de NHP foram aprovadas pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal da Universidade Johns Hopkins, onde este trabalho foi realizado, e conduzidos seguindo as normas do *Weatherall Report, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e *USDA Animal Welfare Act*.

Sete bolsas de sangue de doadores humanos desconhecidos e aleatórios foram obtidas do Banco de Sangue de Nova York (*New York Blood Center*, EUA). As bolsas de sangue continham cerca de 500 ml de sangue total e 70 ml de anticoagulante citrato-fosfato-dextrose (CPD), sendo transportadas e mantidas em temperatura ambiente por até 24 horas depois da coleta. O processamento do sangue foi realizado imediatamente após sua entrega.

6.3.2 Administração de EVs em Sangue *Ex Vivo*

Utilizamos EVs isoladas de células Expi293F-palmGRET (ver 2.3.1), caracterizadas conforme as recomendações do MISEV2023 (Welsh *et al.*, 2024). Em experimentos com restrições temporais, o sangue foi alíquotado em microtubos ou tubos cônicos sob condições estéreis para administração de EVs na concentração de 8×10^8 partículas/ml, conforme descrito anteriormente (Rodriguez *et al.*, 2023). As alíquotas foram imediatamente incubadas a 37 °C sob rotação e mistura a 8 rpm (*Benchmark Scientific Roto-Therm Plus Incubated Rotator*) e mantidas por 5, 10, 15, 30, 60, 120 ou 240 minutos. Em seguida, o sangue foi processado para obtenção de PBMCs. Um controle não tratado (i.e., *mock*) foi processado em paralelo. Um resumo dos experimentos realizados está disposto na Figura 34.

Figura 34 – Resumo Gráfico dos Ensaios de Interação de EVs com Sangue *ex vivo*



Desenho experimental da interação de EVs com sangue *ex vivo* e *in vitro*, utilizando sangue humano e primata. Criado em BioRender.com. FONTE: Bianca C. Pachane (2023).

6.3.3 Isolamento de Células Periféricas Mononucleares Sanguíneas (PBMC)

Amostras de sangue de NHP foram diluídas em solução salina balanceada de Hank (HBSS, 1:1, v/v) e aplicadas a tubos SepMate™-15 (IVD) contendo gradiente de densidade Percoll® (#17-0891-01, Cytiva). Os tubos foram centrifugados a 1.200 x g por 10 minutos para separação trifásica do sangue, com as células mononucleares (MNC) na fração superior. As MNCs foram transferidas a tubos novos, lavadas com HBSS e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos. As células foram tratadas com tampão de lise de hemácias (*ACK lysing buffer*; 0,83% NH₄Cl, 0,1% KHCO₃, 0,03% EDTA) por 10 minutos a 37 °C, lavadas com HBSS e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos.

Amostras de sangue humano foram diluídas em tampão de lavagem (2% FBS, 2 mM EDTA em PBS; 1:1, v/v) e aplicadas em tubos SepMate™-50 (IVD) contendo gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (#17144003, Cytiva). Os tubos

foram centrifugados a 1.200 x g por 10 minutos para separação trifásica do sangue. A fração superior, contendo MNCs, foi transferida para novos tubos, lavadas com tampão de lavagem e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos. Após tratamento com tampão ACK por 10 minutos a 37 °C, as amostras foram lavadas com tampão de lavagem e centrifugadas a 300 x g por 8 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 10% FBS para contagem e medição de viabilidade automática utilizando o método de exclusão por *trypan blue* (Countess II FL, Invitrogen).

6.3.4 Seleção Positiva de Linfócitos B CD20⁺

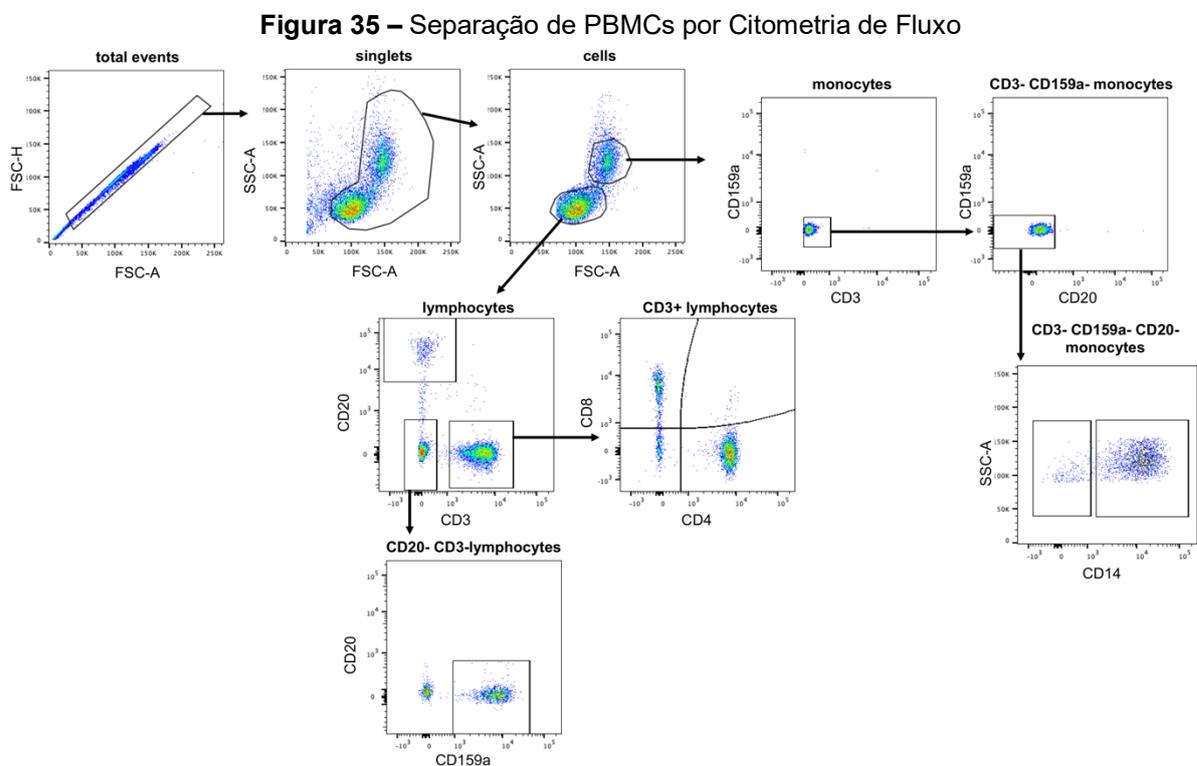
PBMCs (1×10^9 células/ml) foram ressuspensas em tampão de seleção gelado (0,5% BSA e 2 mM EDTA em PBS) e misturadas com 20% de *beads* para separação magnética (CD20 MicroBeads; #130-191-104 ou #130-191-105, Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4 °C. As amostras foram diluídas em 1 ml de tampão de seleção, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos e ressuspensas em 500 µl de tampão de seleção. Utilizando o sistema MiniMACS™ (Miltenyi Biotec) montado com colunas MS (#130-042-201), a separação magnética foi realizada mediante equilíbrio da coluna com tampão de seleção, aplicação da amostra, lavagem e eluição. PBMCs CD20⁻ e linfócitos B CD20⁺ foram coletados em tubos cônicos e concentrados (300 x g, 8 minutos).

Para cultivo primário, os linfócitos B foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina por até dois dias em frascos de cultivo, incubados em estufa a 37 °C, 5% CO₂.

6.3.5 Extinção de Fluorescência com *Trypan Blue* por Citometria de Fluxo

Após administração de EVs por 15, 30 e 60 minutos *ex vivo*, PBMCs isoladas do sangue de NHP e humanos foram ressuspensas em tampão (#420201, BioLegend) e marcadas por 20 minutos em temperatura ambiente com o coquetel de anticorpos contendo mouse-anti-CD3-V500 (1:30, #560770, BD Biosciences), mouse-anti-CD4-PerCP/Cy5.5 (1:7.5, #552838, BD Biosciences), mouse-anti-CD8-BV570 (1:60, #301038, BioLegend), mouse-anti-CD20-e450 (1:60, #48-0209-42, Thermo-Fisher Scientific), mouse-anti-CD159a-PE (1:30, #IM3291U, Beckman Coulter) e mouse-anti-CD14-BV650 (1:30, #563419, BioLegend). As células foram lavadas com

PBS, centrifugadas a 300 x g por 8 minutos e ressuspendidas em 1 ml de PBS. As amostras foram separadas em duas alíquotas cada, sendo uma delas tratada com 0,01% de *trypan blue* a 0,4% para extinção da fluorescência e a outra mantida íntegra em PBS (Loike; Silverstein, 1983; Rodriguez *et al.*, 2023). Ambas as amostras foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences). Amostras controle com “fluorescência menos um” (FMO) para CD159a e CD4 foram utilizadas para *gating* específico das fluorescências de GFP, PE e PerCP/Cy5.5, seguindo a estratégia descrita a seguir (Figura 35).



Estratégia de *gating* para separação de subtipos de PBMC por citometria de fluxo.
FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

6.3.6 Imunofluorescência e Microscopia Confocal

Linfócitos B CD20⁺ e células PBMC CD20⁻ foram aderidos a lâminas recobertas com PLL (#63410-02, Electron Microscopy Sciences) por *cytospin* a 1.000 rpm, 5 minutos (Cytospin 2, Shandon). As lâminas foram secas em temperatura ambiente por 16-18 horas, protegidas da luz e fixadas com PFA 4% por 10 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100

0,1% por 5 minutos em temperatura ambiente. O excesso de detergente foi lavado com PBS duas vezes antes do bloqueio de ligações inespecíficas com 1% BSA-PBS por 1 hora a 4 °C. Células foram expostas aos anticorpos primários conjugados ou não-conjugados por 18 horas a 4 °C, no escuro, em solução de bloqueio (Tabela 11). Células marcadas apenas com CD20 ou CD14 foram duplamente marcadas com Phalloidin-iFluor 647 (1:1.000; #176759, Abcam).

Tabela 11 – Anticorpos Utilizados para Imunofluorescência

Alvo	Tipo de Anticorpo	Diluição	Fabricante	Código
CD27	Primário não-conjugado	1:500	Abcam	131254
Cadeia Pesada da Clatrina	Primário não-conjugado	1:500	Cell Signaling	2410S
CD20	Conjugado (PE)	1:50	Miltenyi Biotec	130-113-374
CD14	Conjugado (PE)	1:50	Miltenyi Biotec	130-113-147
Donkey anti-Rb IgG H&L	Secundário (Alexa Fluor® 647)	1:1.000	Abcam	150075

FONTE: Bianca C. Pachane, 2023.

Após quatro lavagens com PBS, as lâminas contendo anticorpos primários não-conjugados foram expostas ao anticorpo secundário por 1 hora no escuro, a 4 °C. O excesso de anticorpo foi lavado quatro vezes com PBS e as lâminas foram montadas utilizando o meio *Prolong Diamond Antifade Mounting Medium* com DAPI (Invitrogen). As lamínulas foram seladas (#23005, Biotium) e mantidas a 4 °C até a análise.

Imagens de microscopia confocal foram adquiridas no microscópio Zeiss 880 Airyscan FAST, sob aumentos de 40x e 63x, utilizando o *software* Zen 2.3 SP1 (Carl Zeiss AG). Foram utilizados os canais para DAPI, A488, A568 e A657 (*pinhole* 1 AU = 40,3, *master gain* = 850, intensidade do laser a 5,0%) para aquisição de *Z-stacks* com intervalos de 0,3 µm entre imagens, com correção de brilho automática e etapa de otimização da secção. Os *Z-stacks* foram selecionados manualmente com base na localização apical e basal das células. Para a análise de intensidade do EGFP, os *Z-stacks* foram adquiridos sob aumento de 63x, utilizando imagens de 512 x 512 px em velocidade 7 e média 2, em 8-bit de profundidade. Imagens representativas foram obtidas em aumento de 63x, utilizando imagens de 1800 x 1800 px adquiridas em velocidade 7 e média 2, em 16-bit de profundidade. O processamento das imagens e quantificação da intensidade do EGFP foi executada no FIJI (ImageJ) (Schindelin et

al., 2012), contabilizando a fluorescência acima do *threshold* basal de autofluorescência a 7153 px.

6.3.7 Imobilização de Células CD45⁺ em *Chip*

Linfócitos B tratados com EV foram imobilizados em *chips* enriquecidos com CD45 do *kit* de preparação de amostras de linfócito, gentilmente cedidos pela empresa ONI (Oxford, Reino Unido) (Figura 36A-B).

Figura 36 – Imobilização de Células CD45⁺ em *Chips* para dSTORM



A – Preparo de amostras nas raias dos *chips* em ambiente controlado. **B** – Detalhe dos *chips* para dSTORM, com as raias indicando os locais de entrada (IN) e saída (OUT) dos líquidos. FONTE: Bianca C. Pachane (acervo pessoal) e ONI (oni.bio).

Os *chips* foram aclimatados em temperatura ambiente e recobertos com a solução S3 por 15 minutos. As raias do *chip* foram lavadas com PBS e incubadas com solução S5 por 10 minutos. Em seguida, o chip foi lavado com PBS, incubado por 10 minutos a 37 °C e aclimatado com meio RPMI 1640 10% FBS aquecido a 37 °C. Linfócitos B (5×10^5 células em 5 μ l) foram adicionadas a cada raia e incubadas por

10 minutos para adesão. As raia foram lavadas com meio RPMI 1640 10% FBS e fixadas com solução fixativa aquecida (5:11:8 partes do componente fixativo A, água ultrapura, e componente fixativo B, respectivamente; v/v) por 10 minutos em temperatura ambiente. Os chips foram lavados com PBS e PBS com 0,02% de azida sódica antes de serem selados para estocagem a 4 °C por 16-18 horas. Grupos aldeídos não-reativos foram extinguidos com 100 mM de glicina em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% e bloqueadas para ligações não-específicas com BSA-PBS 5% por 30 minutos em temperatura ambiente. Linfócitos B foram marcados com diluição de anti-CD27 (1:500, #131254, Abcam) em solução de Phalloidin-iFluor 647 (1:1000, v/v; #176759, Abcam) por 16-18 horas a 4 °C. As raia foram lavadas com PBS antes da aplicação do anticorpo secundário (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), CF®568; 1 µg/ml, #20801, Biotium). Os chips foram lavados com PBS e selados para análise utilizando microscopia de reconstrução ótica estocástica direta (dSTORM) no microscópio de super-resolução Nanoimager (ONI) (ver 2.3.9).

6.3.8 Fracionamento Celular

Linfócitos B foram coletados em PBS com 1% de inibidor de protease (IP, #161280, Thermo-Fisher Scientific) e estocados a -20 °C. Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 300 x g por 8 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 200 µl de PBS 1% IP. Para lise, as células foram vortexadas por 5 minutos, passadas por agulha de 30 G acoplada a uma seringa de 1 ml por 5 vezes e sonicadas em 3 ciclos de 10 segundos com 10 segundos de espera. As amostras foram centrifugadas a 1.200 x g por 10 minutos a 4 °C para remoção de células intactas remanescentes, e a 100.000 x g por 1 hora a 4 °C para separação das frações de membrana (decantado) da fração citoplasmática (sobrenadante). O sobrenadante foi concentrado utilizando filtros Amicon 4 Ultra RC – 10 kDa MWCO (Merck Millipore). As frações celulares foram analisadas por ensaio de nanoluciferase (ver 6.3.9). A confirmação do fracionamento foi realizada via *western blotting* (ver 2.3.2), para identificação das proteínas de membrana CD63 (1:3.000, #556016, BD) e CD9 (1:3.000, #312102, BioLegend), e proteínas citoplasmáticas GAPDH (1:2.500, #9485, Abcam), calnexina (1:1.000, #22595, Abcam) e β-actina (1:1.000, #3700, Cell Signaling).

6.3.9 Ensaio de Nanoluciferase

A atividade de nanoluciferase foi medida utilizando o *kit NanoGlo® Luciferase Assay System* (N1120, Promega). Frações de EV (1:100, v/v) e linfócitos B (1×10^5 células/ml) foram semeadas em duplicatas ou triplicatas técnicas em placas brancas de 96 poços (3922, Corning). Os controles do ensaio incluíram o branco, contendo veículo (i.e., PBS ou meio RPMI 1640 10% FBS) e controle EV (8×10^8 partículas/ml). As amostras foram misturadas ao reagente do ensaio de luciferase NanoGlo (1:1, v/v) preparado anteriormente pela combinação de 50 partes de tampão para 1 parte de substrato furimazina. A leitura da placa foi realizada imediatamente após a adição do reagente, sob leitura *endpoint* de luminescência a 14.6 mm de altura da placa e integração a 1000, utilizando o leitor SpectraMax iD5 (Molecular Devices).

6.3.10 Análise Estatística

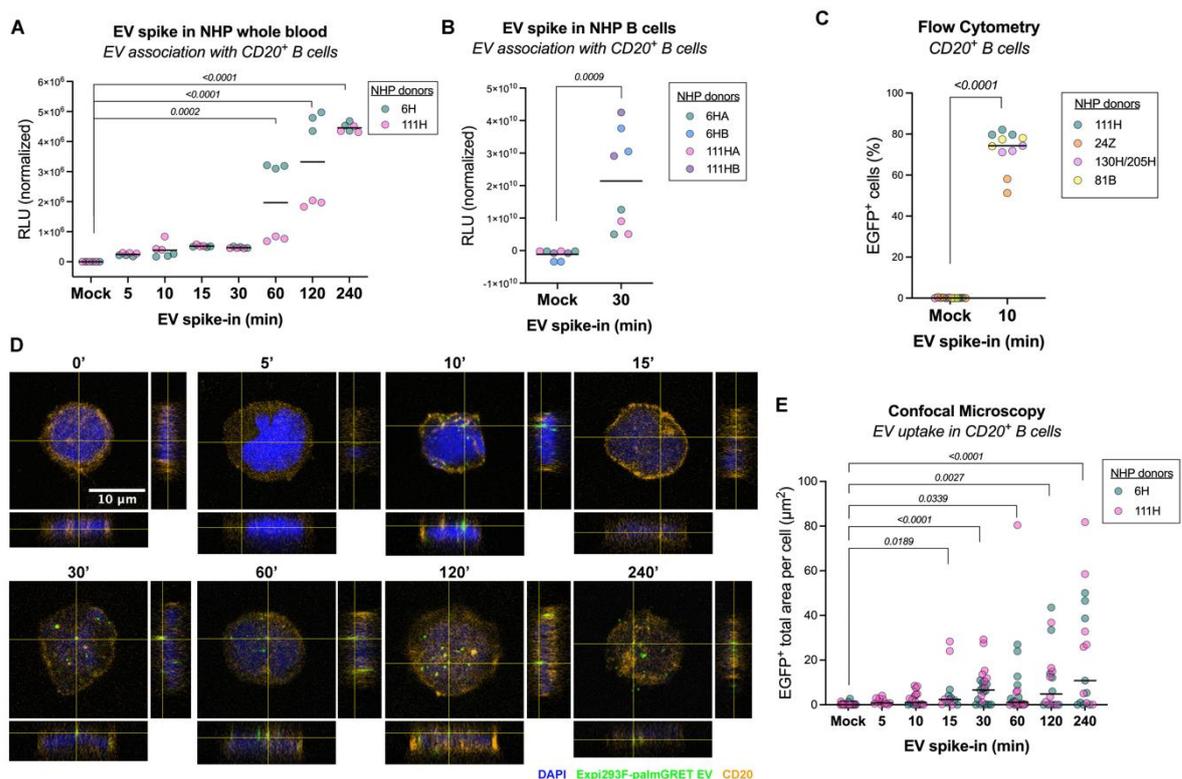
Dados brutos foram checados para *outliers* utilizando o método ROUT, presumindo $Q = 0,1$ (Motulsky; Brown, 2006). Os dados foram transformados e/ou normalizados com base nos controles técnicos de cada método. O teste de D'Agostino-Pearson omnibus K2 foi aplicado para determinação da distribuição dos dados. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA *one-way* ou *two-way* com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, e estão dispostos nos gráficos como média \pm desvio padrão (SD). Dados não-paramétricos foram analisados pela análise de variância de Kruskal-Wallis com pós-teste de múltiplas comparações de Dunn, e estão dispostos nos gráficos como mediana \pm interquartil. As análises estatísticas foram executadas no *software* GraphPad Prism (v. 10.0.1(170)).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Associação e Internalização de EVs em Linfócitos B de NHP

A interação de EVs com células B de primatas foi avaliada por ensaio de nanoluciferase utilizando duas abordagens: (1) após administração no sangue *ex vivo* e (2) após tratamento de células B em cultivo primário. No ensaio *ex vivo*, EVs associam-se a células B após 5 minutos do tratamento e essa interação aumenta continuamente ao longo do tempo, sendo estatisticamente maior a partir de 1 hora (Figura 37A). No ensaio *in vitro*, a associação foi maior após 30 minutos do tratamento (Figura 37B). Estes resultados indicam que componentes do sangue podem interferir nos mecanismos de associação de EVs em células B.

Figura 37 – Associação de EVs com Linfócitos B de NHP



A – Atividade nanoluciferase de linfócitos B CD20⁺ isolados do sangue total de NHP após administração de EVs *ex vivo*. **B** – Atividade nanoluciferase de linfócitos B CD20⁺ em cultivo primário sob ação de EVs *in vitro*. **C** – Linfócitos B positivos para fluorescência EGFP após 10 minutos da administração de EVs em sangue total de NHP, identificados por citometria de fluxo. **D** - Representações ortogonais do ensaio de *uptake* de EVs em células B (núcleos em azul, CD20 em laranja e EVs em verde). Tempos de incubação com EVs descritos acima, em minutos. Barra de escala: 10 µm. **E** - Quantificação da fluorescência EGFP por célula. Valores de *p* identificados acima das comparações estatisticamente relevantes. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

Por citometria de fluxo, observamos que linfócitos B, que compreendem cerca de 5% das PBMCs, continham 72,53% ($\pm 9,57\%$) de EVs fluorescentes 10 minutos após sua administração *ex vivo* (Figura 37C). Houve interação de EVs com outras PBMCs, particularmente monócitos CD14⁺ (89,6% $\pm 7,15\%$), monócitos CD14^{-low} (63,68% $\pm 10,59\%$), linfócitos T CD4 (19,63% $\pm 11,90$) e linfócitos T CD8 (6,62% $\pm 2,76\%$). Não foi observada interação de EVs com células NK CD159a⁺ (0,05% $\pm 0,08\%$). Por microscopia confocal, visualizamos a progressão da captação de EV pelas células B desde sua associação à membrana 5 minutos após sua administração, com internalização iniciando-se após 30 minutos e progredindo até 4 horas (Figura 37D). A quantificação da fluorescência do EGFP corroborou os resultados obtidos no ensaio de nanoluciferase (Fig. 37E).

6.4.2 Internalização de EVs por Mecanismos Dependentes de Clatrina

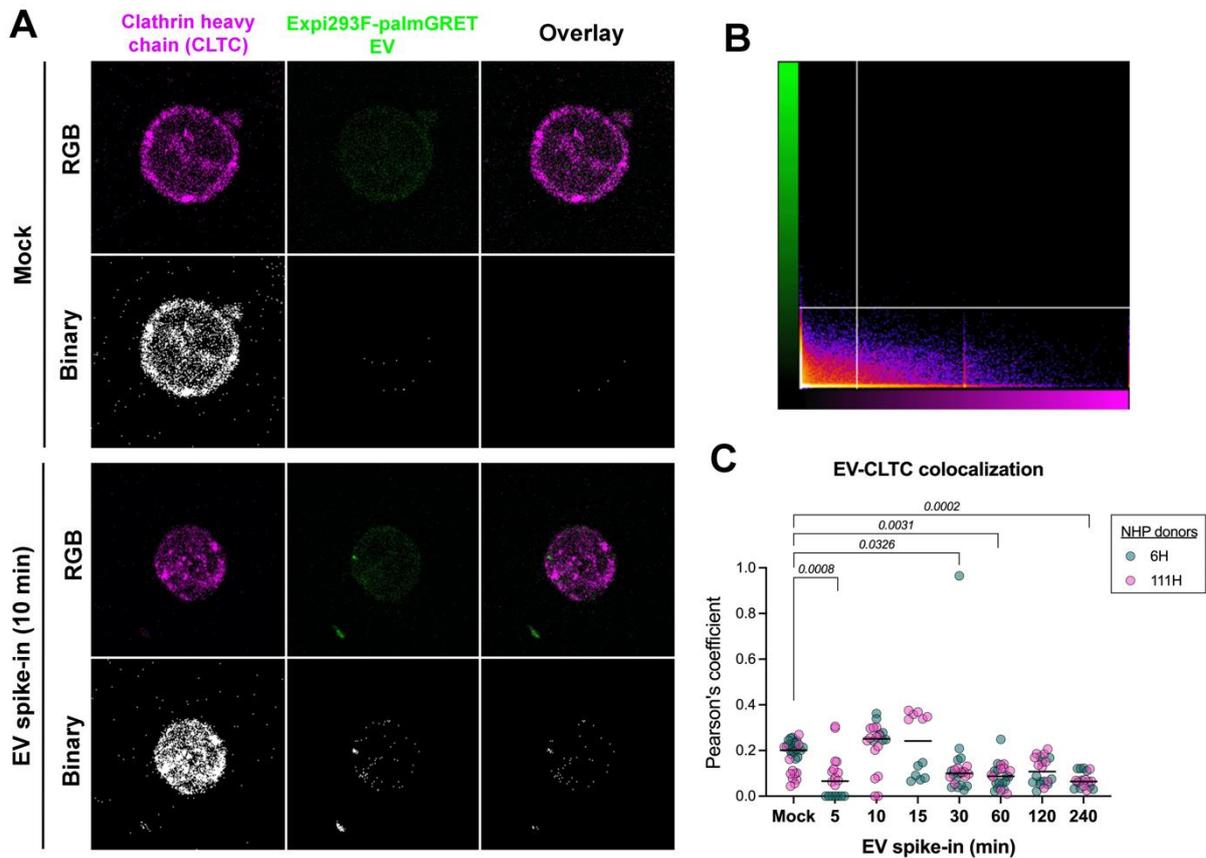
Investigamos se a internalização de EVs por linfócitos B é promovida por mecanismos dependentes de clatrina por ensaio de colocalização. Células B foram marcadas por imunofluorescência com a cadeia pesada da clatrina (CLTC), confirmando sua dispersão ao redor da superfície celular no decorrer dos tempos avaliados. A análise de colocalização foi realizada utilizando um limiar idêntico entre os grupos (Figura 38A), gerando um fluorograma por célula (Figura 38B). Após 5 minutos de administração de EVs, observamos uma queda inicial da colocalização entre CLTC e EV, que é recuperada após 10 e 15 minutos, mas decai novamente após 30 minutos, permanecendo estável até o final do ensaio (Figura 38C). A baixa mediana dos valores do coeficiente de Pearson indica que CLTC não se colocaliza com EVs, sugerindo que a internalização mediada por clatrina não é o único mecanismo de *uptake* utilizado para absorção de EVs.

6.4.3 Associação de EVs com Linfócitos B Humanos *in vitro* e *ex vivo*

Em amostras humanas, o sinal de EGFP é quase exclusivamente encontrado em células B dentre todas as MNCs, sendo presente em média em 65,33%, 71,35% e 81,70% das células B após 15, 30 e 60 minutos da administração de EVs *ex vivo*, respectivamente (Figura 39A). Após a extinção da fluorescência externa às células vivas com *trypan blue*, EGFP foi identificado em 27,52%, 32,72% e

55,33% das células B, respectivamente, confirmando a associação e internalização de EVs por células B (Figura 39B).

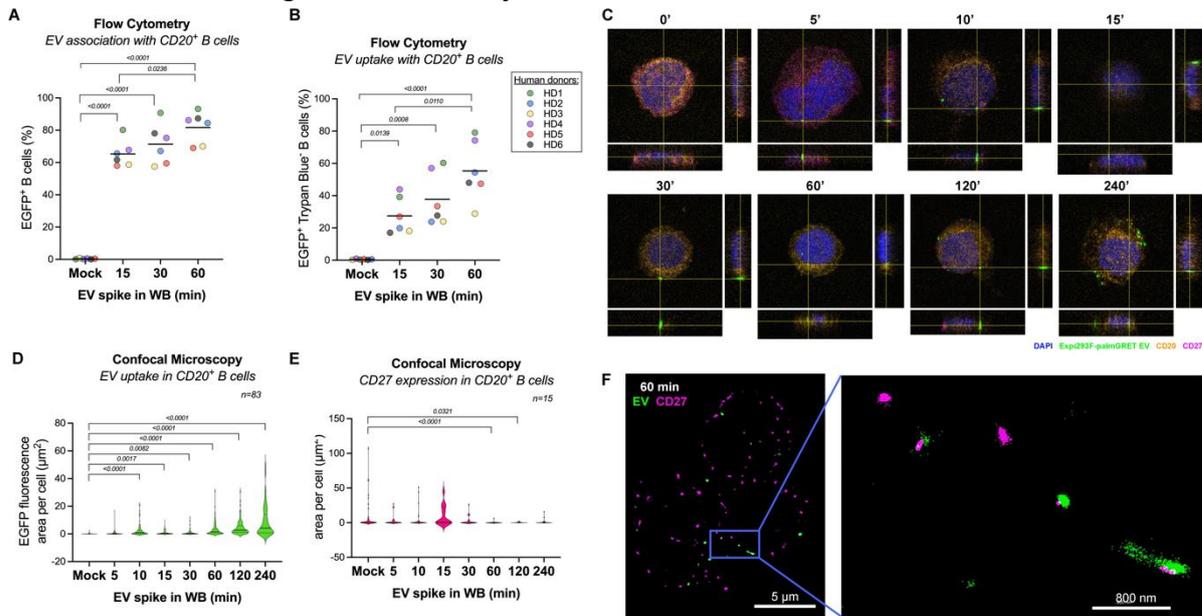
Figura 38 – Internalização de EVs Mediada por Clatrina



A – Imagens de células B marcadas com a cadeia pesada da clatrina (CLTC, rosa) e EVs (verde), comparando as imagens em RGB com a máscara de análise binária. **B** – Fluorograma da colocalização entre clatrina e EVs. **C** – Coeficiente de Pearson das células avaliadas após administração de EVs *ex vivo* entre 5 e 240 minutos. Valores estatisticamente relevantes de *p* dispostos acima das barras comparativas. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

Os resultados da internalização e associação de EVs com células B humanas foram confirmados por microscopia confocal, onde células interagem com EVs após 5 minutos da administração *ex vivo*, sendo internalizadas dentro de 15 minutos e continuando a associar-se pelas quatro horas de ensaio (Figura 39C). A quantificação do sinal de fluorescência EGFP aumentou com o tempo, chegando a limiares estatisticamente relevantes após 10 minutos (Figura 39D). Com isso, corroboramos os resultados anteriores obtidos com células B de NHP, indicando que a associação de EVs com células B não é um mecanismo espécie-específico.

Figura 39 – Associação de EVs com Linfócitos B Humanos



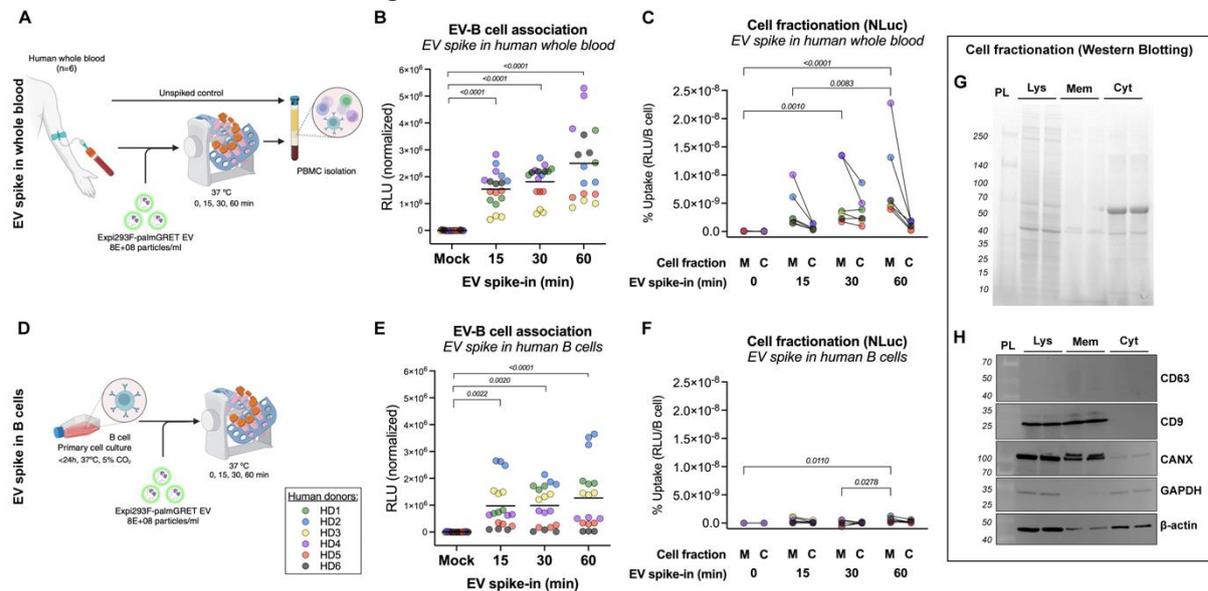
A – Ensaio de associação de EVs em células B após administração *ex vivo* por 15, 30 e 60 minutos. **B** – Ensaio de internalização de EVs em células B humanas por *trypan blue*, após administração *ex vivo* por 15, 30 e 60 minutos. **C** – Representação ortogonal das células B em ensaio de internalização temporal, sob aumento de 63x (núcleos em azul, EVs em verde, CD20 em laranja e CD27 em rosa). Barra de escala: 10 μm. **D** – Quantificação da fluorescência de EGFP por célula. **E** – Quantificação da fluorescência de CD27 por célula. Valores estatisticamente relevantes de *p* dispostos acima das barras comparativas. **F** – Imagens reconstituídas de dSTORM indicando EVs em verde e CD27 em rosa em linfócitos B após 60 minutos de tratamento. Barras de escala: 5 μm (campo aberto), 800 nm (campo fechado). FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

Devido ao aumento da interação de EVs e células B após 4 horas de tratamento, supomos que células B imaturas poderiam estar se diferenciando em outros subtipos. Portanto, investigamos a expressão de CD27, marcador de células B de memória, por meio de microscopia confocal e SRM. A alta expressão de CD27 no grupo não-tratado decai com o passar do tempo e se estabiliza após 4 horas do tratamento, gerando resultados inconclusivos (Figura 39C,E). Entretanto, observamos a interação entre CD27 e EVs em linfócitos CD20⁺/CD45⁺ por SRM, sugerindo que outros *checkpoints* imunes estão sendo estimulados e podem ser investigados futuramente (Figura 39F).

Após confirmar a internalização de EVs, examinamos se elas são absorvidas pelas células B após *uptake*, o que poderia indicar internalização por fusão de membrana e/ou metabolização do conteúdo das EVs. Utilizando o modelo de administração *ex vivo* (Figura 40A), observamos aumento estatisticamente relevante do sinal de nanoluciferase após 15, 30 e 60 minutos do tratamento (Figura 40B). O fracionamento das células B identificou que a maioria do sinal de Nluc está nas frações

membranosas, mas parte do sinal foi encontrada em frações citoplasmáticas, indicando que EVs podem ter sido metabolizadas pelas células após internalização.

Figura 40 – Fracionamento de Linfócitos B



A – Diagrama da administração de EV *ex vivo*. **B** – Associação de EVs em células B após administração *ex vivo*, por ensaio de nanoluciferase. **C** – Análise de frações de membrana (M) e citoplasma (C) de linfócitos B administrado com EVs *ex vivo* por 15, 30 e 60 minutos por nanoluciferase. **D** – Diagrama do ensaio de tratamento de EVs em células B *in vitro*. **E** – Associação de EVs em células B após tratamento *in vitro*, por nanoluciferase. **F** – Análise do fracionamento celular de linfócitos B humanos após tratamento *in vitro* por 15, 30 e 60 minutos. Valores estatisticamente relevantes de *p* dispostos nas barras comparativas. **G** – Perfil proteico de amostras de lisado (Lys), membrana (Mem) e citoplasma (Cyt) de células B submetidas à fracionamento. Massa molecular dos marcadores proteicos (PL) indicadas à esquerda, em kDa. (H) Membranas com amostras do fracionamento celular avaliadas para CD63, CD9, calnexina (CANX), GAPDH e β -actina. FONTE: Pachane *et al.* (em preparação).

A associação de EVs em células B é maior em sangue total que em células em cultivo. Ao comparar os resultados *ex vivo* com as análises *in vitro*, em que as EVs são administradas a células CD20⁺ em cultivo primário (Figura 38D), há tendência de aumento da associação de EVs com o decorrer do tempo, mas em proporção menor (Figura 40E). O fracionamento das células indicou sinal de Nluc mais fraco no geral, com maior proporção encontrada nas frações de membrana e quase sem sinal nas frações citoplasmáticas (Figura 40F). Esses resultados indicam que a internalização de EVs por células B pode ser observada utilizando técnicas *in vitro* e *ex vivo* mas componentes externos presentes no sangue total podem potencializar e promover mecanismos de internalização distintos.

O protocolo de fracionamento foi confirmado via *western blotting* qualitativo, onde verificamos perfis proteicos diferentes entre os lisados celulares e amostras de membrana e citoplasma (Figura 40G). As tetraspaninas CD63 e CD9 foram encontradas no lisado e membrana apenas, enquanto GAPDH foi observado no lisado e no citoplasma. Calnexina, uma proteína do retículo endoplasmático, foi encontrada majoritariamente em membranas, e β -actina, proteína do citoesqueleto, é mais abundante no citoplasma (Figura 40H).

6.5 DISCUSSÃO

A descoberta de que EVs interagem expressivamente com células B após 10 minutos da administração intravenosa em primatas implica claramente que novas pesquisas com cunho terapêutico para EVs são viáveis, mas há dúvidas se os resultados obtidos em macacos é reproduzível em humanos (Driedonks *et al.*, 2022). O desenvolvimento de um método *ex vivo* que recapitulou o estudo *in vivo* nos permite investigar a fundo os mecanismos que levaram ao tropismo de EVs à células B, evitando prejuízo aos animais (Rodriguez *et al.*, 2023). Neste capítulo, utilizamos o modelo *ex vivo* para determinar possíveis tipos de interação entre EVs e linfócitos B, testando a reprodutibilidade do método em amostras de sangue humano e como esse comportamento se altera em ensaios *in vitro*.

Corroboramos resultados anteriores de que EVs são internalizadas por linfócitos B de NHP e observamos que componentes do sangue podem ser essenciais para que a associação aconteça, visto que resultados *in vitro* e *ex vivo* não foram sempre similares (Rodriguez *et al.*, 2023). Em amostras com EVs administradas no sangue, a rápida associação seguida de internalização que persiste por até quatro horas após o tratamento sugere que múltiplos mecanismos estão envolvidos de forma complementar neste processo (van Niel *et al.*, 2022). Verificamos que a fluorescência restrita às células B aumenta com o tempo de exposição a EVs mesmo sem readministração, implicando que a fusão direta das membranas é um dos possíveis mecanismos de internalização. A associação de EVs em PBMCs de NHP ocorreu em menor escala em monócitos e células T CD3⁺, sugerindo que o tratamento foi potencialmente em dose superior ao suportado e as partículas estão sendo depuradas pela ação fagocitária das células do sistema Imune (Gustafson *et al.*, 2015).

A identificação dos mecanismos de internalização em amostras derivadas de primatas foi desafiadora, considerando quão relativamente baixa é a disponibilidade de marcadores e reagentes viáveis em comparação a humanos ou modelos murinos. O uso de técnicas como IF ou *western blotting* requer o uso de anticorpos que são desenvolvidos para ligação com epítopos específicos de um antígeno, e este pode ou não ter reação cruzada devido à conservação evolutiva das regiões de interesse (Frank, 2002). Felizmente, pudemos investigar a cadeia pesada de clatrina, proteína responsável pelo mecanismo de endocitose mais comum para internalização de EVs, devido a reatividade cruzada do anticorpo para amostras de

macaco (Mulcahy; Pink; Carter, 2014). Entretanto, nossos resultados sugeriram que a clatrina, apesar de claramente envolvida na internalização de EVs, não é o principal mecanismo de *uptake* neste caso. Nossa hipótese sugere que EVs são internalizadas parcialmente por mecanismos dependentes de clatrina, por mecanismos independentes de clatrina e por fusão direta, sem que um processo se sobreponha aos outros.

A dificuldade prática no trabalho investigativo de amostras de primatas em biologia molecular junto da questão sobre o tropismo de EVs ser devido à origem das vesículas, provenientes de células de origem humana, nos levou a investigar se a interação de EVs em células B humanas ocorre de forma similar. Utilizando o mesmo desenho *ex vivo* e doadores anônimos escolhidos aleatoriamente, resultados similares aos encontrados em NHP foram observados. Assim como observado com primatas, a interação de EVs *ex vivo* ocorre rapidamente após a administração e persiste por quatro horas, tendo uma proporção das partículas internalizada e outra disposta na superfície celular. Entretanto, contrário do observado em primatas, não houve interação significativa entre EVs e outras PBMCs em humanos. Dessa forma, supomos que o mecanismo de *uptake* e associação de EVs em células B é conservado entre NHP e humanos, com resultados recapitulando o tropismo observado *in vivo* em *Macaca nemestrina* (Driedonks *et al.*, 2022; Rodriguez *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos em humanos nos permitiram investigar diferentes subtipos de células B, a fim de determinar se a exposição à EVs gerava alguma diferenciação ou apresentava tropismo para um subtipo específico. Células B são componentes vitais do sistema imune adaptativo e podem ser classificadas conforme sua função e expressão relativa de marcadores de superfície, especialmente CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, e CD24 (Sanz *et al.*, 2019). A ontogenia das células B inclui células transicionais, imaturas, células de zona marginal (MZB) e de memória, que podem estar inativadas ou ativadas (Sanz *et al.*, 2019; Velounias; Tull, 2023). Investigamos por IF a expressão de CD27 após exposição de EVs *ex vivo* e obtivemos uma redução estatística após 2 horas de tratamento, sugerindo que as células estão mais propensas ao fenótipo imaturo (CD27^{-lo}) que ao fenótipo de memória, que é majoritariamente CD27⁺ (Velounias; Tull, 2023). Ensaios *ex vivo* foram limitados devido ao tempo máximo de estabilidade do sangue, que foi padronizado previamente

mediante contagem de plaquetas, o que dificultou a investigação da interação de EVs com subpopulações de células B e gerou conclusões parciais.

6.6 CONCLUSÃO

A utilização do método *ex vivo* para estudos de internalização de EVs replica fidedignamente resultados obtidos *in vivo* em primatas e é uma alternativa mais interessante que o estudo *in vitro*, no qual parte da complexidade encontrada em organismos complexos é perdida. A abrangente variabilidade de mecanismos de internalização investigados sugere múltiplos mecanismos potenciais a serem explorados para melhorar ou reduzir o tropismo de EVs, como a modificação de proteínas de corona. Ademais, estes resultados demonstram um novo avanço para responder perguntas de interesse para a saúde humana, especialmente referente a estudos de farmacocinética e biodistribuição.

REFERÊNCIAS

ALBLAZI, Kamila Mohamed Om; SIAR, Chong Huat. Cellular protrusions--lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes--and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 2187–2191, 2015.

ALTEI, Wanessa F. *et al.* Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular vesicles. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 158, 2020.

ALTEI, Wanessa Fernanda *et al.* New insights into the discovery of drugs for triple-negative breast cancer metastasis. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 365–376, 2022.

AMOS, Sebastian E.; CHOI, Yu Suk. The Cancer Microenvironment: Mechanical Challenges of the Metastatic Cascade. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.625859>. Acesso em: 6 abr. 2024.

ATKIN-SMITH, Georgia K. *et al.* A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 7439, 2015.

BATTISTELLI, Michela; FALCIERI, Elisabetta. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. **Biology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 21, 2020.

BERNHARDT, Stephan *et al.* Functional Proteomics of Breast Cancer Metabolism Identifies GLUL as Responder during Hypoxic Adaptation. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1352–1362, 2019.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.

BOS, Reinhard *et al.* Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1573–1581, 2003.

BRENNAN, K. *et al.* A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1039, 2020.

CARTER, Rachel Zoe *et al.* Tumour but not stromal expression of $\beta 3$ integrin is essential, and is required early, for spontaneous dissemination of bone-metastatic breast cancer. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 235, n. 5, p. 760–772, 2015.

CASALI, Bruna Carla *et al.* Blockage of $\alpha\beta 3$ integrin in 3D culture of triple-negative breast cancer and endothelial cells inhibits migration and discourages endothelial-to-mesenchymal plasticity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 38, p. 101686, 2024.

CASALI, Bruna C. *et al.* The Effects of $\alpha\beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 1745, 2022.

CERAPIO, Juan Pablo *et al.* Integrated spatial and multimodal single-cell transcriptomics reveal patient-dependent cell heterogeneity in splenic marginal zone lymphoma. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/path.6296>. Acesso em: 3 jun. 2024.

CHAMBERS, Ann F.; WERB, Zena. Invasion and metastasis—recent advances and future challenges. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 361–368, 2015.

CHARGAFF, Erwin. The Coagulation of Blood. *In: ADVANCES IN ENZYMOLOGY AND RELATED AREAS OF MOLECULAR BIOLOGY*. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 1945. p. 31–65. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470122501.ch2>. Acesso em: 9 abr. 2024.

CLOS-SANSALVADOR, Marta *et al.* Commonly used methods for extracellular vesicles' enrichment: Implications in downstream analyses and use. **European Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 151227, 2022.

COUCH, Yvonne *et al.* A brief history of nearly EV-erything - The rise and rise of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 10, n. 14, p. e12144, 2021.

CRAWFORD, N. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 53–69, 1971.

CUI, Haissi *et al.* On the Pro-Metastatic Stress Response to Cancer Therapies: Evidence for a Positive Co-Operation between TIMP-1, HIF-1 α , and miR-210. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 3, 2012. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2012.00134/full>. Acesso em: 14 maio 2024.

DAABOUL, George G. *et al.* Digital Detection of Exosomes by Interferometric Imaging. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 37246, 2016.

DAGOGO-JACK, Ibiayi; SHAW, Alice T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 81–94, 2018.

DANILUCCI, Taís M. *et al.* Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 27, 2019.

DE JONG, Olivier G. *et al.* Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2012.

DEJANA, Elisabetta. Endothelial cell–cell junctions: happy together. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 261–270, 2004.

DERITA, Rachel M. *et al.* Tumor-Derived Extracellular Vesicles Require β1 Integrins to Promote Anchorage-Independent Growth. **iScience**, [s. l.], v. 14, p. 199–209, 2019.

DERYNCK, Rik; ZHANG, Ying E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. **Nature**, [s. l.], v. 425, n. 6958, p. 577–584, 2003.

DEY, Madhuri *et al.* Studying tumor angiogenesis and cancer invasion in a 3D vascularized breast cancer microenvironment. **Advanced biology**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. e2100090, 2021.

DOLO, V. *et al.* Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 58, n. 19, p. 4468–4474, 1998.

DOS SANTOS, Patty K. *et al.* Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein, attenuates $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ integrin and VEGF receptor 2 signaling resulting in angiogenesis inhibition. **Biochimie**, [s. l.], v. 174, p. 144–158, 2020.

DRIEDONKS, Tom *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of extracellular vesicles administered intravenously and intranasally to *Macaca nemestrina*. **Journal of Extracellular Biology**, [s. l.], v. 1, n. 10, p. e59, 2022.

DUONG, Cao Nguyen; VESTWEBER, Dietmar. Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.00519/full>. Acesso em: 21 jun. 2024.

ERSHOV, Dmitry *et al.* TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. **Nature Methods**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 829–832, 2022.

ESTIMATIVA 2023: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 11 abr. 2024.

EVEN-RAM, Sharona; ARTYM, Vira. **Extracellular Matrix Protocols: Second Edition**. [S. l.]: Humana Press, 2009.

EVTUSHENKO, Evgeniy G. *et al.* Adsorption of extracellular vesicles onto the tube walls during storage in solution. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. e0243738, 2020.

FRANK, Steven A. Specificity and Cross-Reactivity. *In: IMMUNOLOGY AND EVOLUTION OF INFECTIOUS DISEASE*. [S. l.]: Princeton University Press, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2396/>. Acesso em: 24 jun. 2024.

FRIEDL, Peter; ALEXANDER, Stephanie. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. **Cell**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 992–1009, 2011.

GAUDET, Pascale *et al.* Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 449–462, 2011.

GE, Qinyu *et al.* miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 1568–1575, 2014.

GEIGER, Florian *et al.* Fiber stiffness, pore size and adhesion control migratory phenotype of MDA-MB-231 cells in collagen gels. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. e0225215, 2019.

GENIN, Marie *et al.* M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 577, 2015.

GHOLAMI, Amin Moghaddas *et al.* Global Proteome Analysis of the NCI-60 Cell Line Panel. **Cell Reports**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 609–620, 2013.

GÖRGENS, André *et al.* Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e12238, 2022.

GRAYSON, Warren L. *et al.* Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 358, n. 3, p. 948–953, 2007.

GREIJER, A. E.; WALL, E. van der. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 1009, 2004.

GUO, Mingzhang *et al.* VE-cadherin and β -catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, [s. l.], v. 294, n. 4, p. C977–C984, 2008.

GUSTAFSON, Heather Herd *et al.* Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. **Nano today**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 487–510, 2015.

HAMIDI, Hellyeh; IVASKA, Johanna. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 533–548, 2018.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANNAFON, Bethany N. *et al.* Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is transferred by exosomes and contributes to the regulation of hypoxia and estrogen signaling in breast cancer cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 13, 2019.

HARBECK, Nadia *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–31, 2019.

HERMANN, Michaela-Rosemarie *et al.* Integrins synergise to induce expression of the MRTF-A-SRF target gene ISG15 for promoting cancer cell invasion. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 129, n. 7, p. 1391–1403, 2016.

HERRMANN, Inge Katrin; WOOD, Matthew John Andrew; FUHRMANN, Gregor. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. **Nature Nanotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 748–759, 2021.

HOFFMANN, Céline *et al.* Hypoxia promotes breast cancer cell invasion through HIF-1 α -mediated up-regulation of the invadopodial actin bundling protein CSRP2. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 10191, 2018.

HOSHINO, Daisuke *et al.* Exosome Secretion Is Enhanced by Invadopodia and Drives Invasive Behavior. **Cell Reports**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 1159–1168, 2013.

HOSHINO, Ayuko *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, [s. l.], v. 527, n. 7578, p. 329–335, 2015.

HUANG, Guan *et al.* Emerging technologies for profiling extracellular vesicle heterogeneity. **Lab on a Chip**, [s. l.], v. 20, n. 14, p. 2423–2437, 2020.

HURWITZ, Stephanie N.; MECKES, David G. Extracellular Vesicle Integrins Distinguish Unique Cancers. **Proteomes**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 14, 2019.

ITO, Kotaro *et al.* Matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by HIF-1-dependent and epigenetic mechanisms and serves a tumor-suppressive role in gastric cancer progression. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1–15, 2021.

JARA, Lilian *et al.* Mutations in BRCA1, BRCA2 and other breast and ovarian cancer susceptibility genes in Central and South American populations. **Biological research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 35, 2017.

JAYASINGAM, Sharmilla Devi *et al.* Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities

and Challenges in Routine Clinical Practice. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 9, p. 1512, 2020.

JIANG, Hongxia *et al.* Hypoxia Induced Changes of Exosome Cargo and Subsequent Biological Effects. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.824188/full>. Acesso em: 14 maio 2024.

JIMENEZ, Lizandra *et al.* Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 947–959, 2019.

JIN, Ming-Zhu; JIN, Wei-Lin. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–16, 2020.

KANCHANAWONG, Pakorn; CALDERWOOD, David A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 142–161, 2023.

KANG, Matthew *et al.* Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. e12085, 2021.

KARTIKASARI, Apriliana E. R. *et al.* Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.692142/full>. Acesso em: 30 abr. 2024.

KAY, Robert R. Macropinocytosis: Biology and mechanisms. **Cells & Development**, [s. l.], v. 168, Quantitative Cell and Developmental Biology, p. 203713, 2021.

KENNEL, Kilian B. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts in Inflammation and Antitumor Immunity. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1009–1016, 2023.

KIM, Hyo In *et al.* Recent advances in extracellular vesicles for therapeutic cargo delivery. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 836–849, 2024.

KING, Hamish W.; MICHAEL, Michael Z.; GLEADLE, Jonathan M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 421, 2012.

KIRCHHAUSEN, Tom; OWEN, David; HARRISON, Stephen C. Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. a016725, 2014.

KOWAL, Joanna *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 8, p. E968–E977, 2016.

KUCHARZEWSKA, Paulina; BELTING, Mattias. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 20304, 2013.

LEBER, Thomas M.; BALKWILL, Frances R. Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 24–28, 1997.

LIN, Andrew A. *et al.* Extracellular Vesicle–Based Multianalyte Liquid Biopsy as a Diagnostic for Cancer. **Annual Review of Biomedical Data Science**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 269–292, 2022.

LOCONTE, Luisa *et al.* Detection of the interactions of tumour derived extracellular vesicles with immune cells is dependent on EV-labelling methods. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 12384, 2023.

LOIKE, J. D.; SILVERSTEIN, S. C. A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 57, n. 1–3, p. 373–379, 1983.

LÖTVALL, Jan *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, p. 26913, 2014.

LUGANO, Roberta; RAMACHANDRAN, Mohanraj; DIMBERG, Anna. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 77, n. 9, p. 1745–1770, 2020.

MAJMUNDAR, Amar J.; WONG, Waihay J.; SIMON, M. Celeste. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 294–309, 2010.

MATHIEU, Mathilde *et al.* Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 9–17, 2019.

MAVADDAT, Nasim *et al.* Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. **The American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 21–34, 2019.

MAZIA, D; SCHATTEIN, G; SALE, W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 198–200, 1975.

MEIER, Florian *et al.* Online Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer *. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 2534–2545, 2018.

MEIER, Florian *et al.* Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped

Ion Mobility Device. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 5378–5387, 2015.

MELLO, Ashley M. *et al.* Hypoxia promotes an inflammatory phenotype of fibroblasts in pancreatic cancer. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–9, 2022.

MILACIC, Marija *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 52, n. D1, p. D672–D678, 2024.

MILANE, Lara *et al.* Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 219, Drug Delivery Research in North America – Part I, p. 278–294, 2015.

MIRANDA-AZPIAZU, Patricia *et al.* A novel dynamic multicellular co-culture system for studying individual blood-brain barrier cell types in brain diseases and cytotoxicity testing. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8784, 2018.

MONTENEGRO, Cyntia F. *et al.* Inhibition of $\alpha\beta3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.

MORITZ, Milene N. O. *et al.* Biphasic $\alpha2\beta1$ Integrin Expression in Breast Cancer Metastasis to Bone. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 13, p. 6906, 2021.

MOSSMANN, Dirk; PARK, Sujin; HALL, Michael N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 744–757, 2018.

MOTULSKY, Harvey J.; BROWN, Ronald E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 123, 2006.

MULCAHY, Laura Ann; PINK, Ryan Charles; CARTER, David Raul Francisco. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 24641, 2014.

NAGINI, Siddavaram. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 152–163, 2017.

NAJAFI, Masoud; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEI, Keywan. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 2782–2790, 2019.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo *et al.* Subtypes of Breast Cancer. *In*: MAYROVITZ, Harvey N. (org.). **Breast Cancer**. Brisbane (AU): Exon Publications, 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>. Acesso em: 11 abr. 2024.

OVERALL, Christopher Mark; LÓPEZ-OTÍN, Carlos. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 657–672, 2002.

PACHANE, Bianca Cruz *et al.* Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, p. 12646, 2022.

PACHANE, Bianca Cruz; SELISTRE-DE-ARAUJO, Heloisa S. The Role of $\alpha v\beta 3$ Integrin in Cancer Therapy Resistance. **Biomedicines**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1163, 2024.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. **Cancer Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 98–101, 1989.

PALAZZOLO, Gemma *et al.* Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 847–860, 2012.

PANG, Zhiqiang *et al.* Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1735–1761, 2022.

PARK, Josiah Voth *et al.* Tumor Cells Modulate Macrophage Phenotype in a Novel In Vitro Co-Culture Model of the NSCLC Tumor Microenvironment. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1178–1191, 2022.

PARTON, Robert G.; DEL POZO, Miguel A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 98–112, 2013.

PEREZ-RIVEROL, Yasset *et al.* The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. D1, p. D543–D552, 2022.

QIU, Yu; LI, Peng; JI, Chunyan. Cell Death Conversion under Hypoxic Condition in Tumor Development and Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 25536–25551, 2015.

QUAIL, Daniela F.; JOYCE, Johanna A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RAMESH, Vignesh; BRABLETZ, Thomas; CEPPI, Paolo. Targeting EMT in Cancer with Repurposed Metabolic Inhibitors. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 942–950, 2020.

RANA, Nishant Kumar; SINGH, Priya; KOCH, Biplob. CoCl₂ simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. **Biological Research**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 12, 2019.

RAPOSO, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 183, n. 3, p. 1161–1172, 1996.

- RASHID, Mohsen *et al.* Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. **Gene**, [s. l.], v. 798, p. 145796, 2021.
- REBELO, Sofia P. *et al.* 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. **Biomaterials**, [s. l.], v. 163, p. 185–197, 2018.
- REYNOLDS, David E. *et al.* Double Digital Assay for Single Extracellular Vesicle and Single Molecule Detection. **Advanced Science**, [s. l.], v. 10, n. 33, p. 2303619, 2023.
- RODRIGUEZ, Blanca V. *et al.* An ex vivo model of interactions between extracellular vesicles and peripheral mononuclear blood cells in whole blood. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 12368, 2023.
- RUNDQVIST, H.; JOHNSON, R. S. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 274, n. 2, p. 105–112, 2013.
- SANTIAGO-DIEPPA, David R. *et al.* Extracellular vesicles as a platform for “liquid biopsy” in glioblastoma patients. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 819–825, 2014.
- SANZ, Ignacio *et al.* Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02458/full>. Acesso em: 24 jun. 2024.
- SCHERMELLEH, Lothar *et al.* Super-resolution microscopy demystified. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 72–84, 2019.
- SCHINDELIN, Johannes *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SCHMALTZ, Cornelius *et al.* Regulation of Proliferation-Survival Decisions during Tumor Cell Hypoxia. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 2845–2854, 1998.
- SCHÜRZ, Melanie *et al.* EVAnalyzer: High content imaging for rigorous characterisation of single extracellular vesicles using standard laboratory equipment and a new open-source ImageJ/Fiji plugin. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 12282, 2022.
- SESE, Marta *et al.* Hypoxia-mediated translational activation of ITGB3 in breast cancer cells enhances TGF- β signaling and malignant features in vitro and in vivo. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 70, p. 114856–114876, 2017.
- SHATTIL, Sanford J.; KIM, Chungho; GINSBERG, Mark H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 288–300, 2010.
- SHIMODA, Masayuki. Chapter Two - Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment. *In*: MAKOWSKI, Gregory S. (org.).

Advances in Clinical Chemistry. [S. l.]: Elsevier, 2019. v. 88, p. 35–66. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242318300726>. Acesso em: 24 abr. 2024.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023.

SINGH, Rakesh K. *et al.* Detection by super-resolution microscopy of viral proteins inside bloodborne extracellular vesicles. **Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 557–67, 2023.

SOUNG, Young Hwa *et al.* Roles of integrins in regulating metastatic potentials of cancer cell derived exosomes. **Molecular & Cellular Toxicology**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 233–237, 2019.

SRIVASTAVA, Nityanand *et al.* Hypoxia: syndicating triple negative breast cancer against various therapeutic regimens. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 13, p. 1199105, 2023.

STEEG, Patricia S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.

STEGEN, Steve *et al.* HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. **Nature**, [s. l.], v. 565, n. 7740, p. 511–515, 2019.

STRANDE, Vaik *et al.* The proteome of the human breast cancer cell line MDA-MB-231: Analysis by LTQ-Orbitrap mass spectrometry. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 41–50, 2009.

SUNG, Bong Hwan *et al.* A live cell reporter of exosome secretion and uptake reveals pathfinding behavior of migrating cells. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2092, 2020.

SZKLARCZYK, Damian *et al.* The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D638–D646, 2023.

TANG, Tao *et al.* Glass based Micro Total Analysis Systems: Materials, Fabrication methods, and Applications. **Sensors and Actuators B Chemical**, [s. l.], v. 339, 2021.

TAWARE, Ravindra *et al.* Extracellular volatilomic alterations induced by hypoxia in breast cancer cells. **Metabolomics**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 21, 2020.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2019.

THÉRY, Clotilde *et al.* Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 3.22.1-3.22.29, 2006.

THÉRY, Clotilde *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**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TYANOVA, Stefka *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 731–740, 2016.

TYANOVA, Stefka; TEMU, Tikira; COX, Juergen. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 2301–2319, 2016.

VAN DEUN, Jan *et al.* EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. **Nature Methods**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 228–232, 2017.

VAN NIEL, Guillaume *et al.* Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 369–382, 2022.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018.

VELOUNIAS, Rebekah L; TULL, Thomas J. Human B-cell subset identification and changes in inflammatory diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 210, n. 3, p. 201–216, 2023.

VISSER, Karin E. de; JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 374–403, 2023.

WANG, Ting *et al.* Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 31, p. E3234–E3242, 2014.

WANG, Shujing *et al.* Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. **npj Precision Oncology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–19, 2024.

WELCH, Danny R.; HURST, Douglas R. Defining the Hallmarks of Metastasis. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, n. 12, p. 3011–3027, 2019.

WELSH, Joshua A. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. e12404, 2024.

WENG, Yueh-Shan *et al.* MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 42, 2019.

WIKLANDER, Oscar P. B. *et al.* Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 4, p. 10.3402/jev.v4.26316, 2015.

WINKLER, Juliane *et al.* Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 5120, 2020.

WOLF, Martin *et al.* A functional corona around extracellular vesicles enhances angiogenesis, skin regeneration and immunomodulation. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e12207, 2022.

WOLF, Peter. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 269–288, 1967.

WU, Anthony Yan-Tang *et al.* Multiresolution Imaging Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer Identifies Distinct Biodistribution Profiles of Extracellular Vesicles and Exomeres with Redirected Tropism. **Advanced Science**, [s. l.], v. 7, n. 19, p. 2001467, 2020.

XIE, Jing *et al.* Hypoxia regulates stemness of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Medical Oncology**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 42, 2016.

XU, Rong *et al.* Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 617–638, 2018.

YEH, Chiuan-Ren *et al.* Estrogen receptor α in cancer associated fibroblasts suppresses prostate cancer invasion via reducing CCL5, IL6 and macrophage infiltration in the tumor microenvironment. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 15, p. 7, 2016.

YOUNG, Lesley *et al.* Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 929–934, 2010.

YU, Chaoping *et al.* Poly-L-lysine-caused cell adhesion induces pyroptosis in THP-1 monocytes. **Open Life Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 279–283, 2022.

YUNNA, Chen *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 877, p. 173090, 2020.

ZHANG, Ying *et al.* Hypoxia in Breast Cancer—Scientific Translation to Therapeutic and Diagnostic Clinical Applications. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, p. 652266, 2021.

ZITVOGEL, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 594–600, 1998.

ANEXO A – Manuscrito Submetido para a Revista *Journal of Extracellular Biology*

Long title: Immobilization of extracellular vesicles on glass coverslips for super-resolution
microscopy and functional assays

Short title: Extracellular vesicle immobilization on glass coverslips

Bianca C. Pachane^{1,2}, Bess Carlson¹, Suzanne E. Queen¹, Heloisa S. Selistre-de-Araujo²,
Kenneth W. Witwer^{1*}

¹ Department of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

² Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brazil.

* Corresponding author:
E-mail: kwitwer1@jhmi.edu

ORCID:

BCP: 0000-0002-7302-4498

HSSA: 0000-0002-2372-7814

KWW: 0000-0003-1664-4233

Abstract

The “stickiness” of extracellular vesicles (EVs) can pose challenges for EV processing and storage, but adhesive properties may also be exploited to immobilize EVs directly on surfaces for various measurement techniques, including super-resolution microscopy. Direct adhesion to surfaces may allow examination of broader populations of EVs than molecular affinity approaches, which can also involve specialized, expensive affinity reagents. Here, we report on the interaction of EVs with borosilicate glass and quartz coverslips and on the effects of pre-coating coverslips with poly-L-lysine (PLL), a reagent commonly used to facilitate interactions between negatively charged surfaces of cells and amorphous surfaces. Additionally, we compared two mounting media conditions for super-resolution microscopy (SRM) imaging and used immobilized EVs for a B-cell interaction test. Our findings suggest that borosilicate glass coverslips immobilize EVs better than quartz glass coverslips. We also found that PLL is not strictly required for EV retention but contributes to the uniform distribution of EVs on borosilicate glass coverslips. Overall, these findings suggest that standard lab materials like borosilicate glass coverslips, with or without PLL, can be effectively used for the immobilization of EVs in specific imaging techniques.

Keywords: Extracellular vesicles; super-resolution microscopy; poly-l-lysine; adhesion.

Introduction

Extracellular vesicles (EV) adhesive properties arise from phenomena including charge (the EV surface is usually negatively charged) and molecular affinities due to the presence of, e.g., integrins and other adhesion molecules (1). Multiple studies have investigated EV interactions with specific materials, often in hopes of reducing negative consequences such as loss to

surfaces during EV storage (2–4). However, direct immobilization of EVs onto materials such as glass might also allow for the improvement of techniques including fluorescence microscopy.

Traditionally, EVs have been captured for imaging using molecular affinity reagents such as antibodies (5,6). Alternatively, glass slides and coverslips can also be coated with poly-L-lysine (PLL) or poly-D-lysine (PDL). As polymerized amino acids with cationic charge, these reagents enhance the capture of negatively charged particles (7,8).

Non-specific immobilization may be especially valuable now that super-resolution (SRM) has evolved to enable semi-quantitative multiplexed single-molecule characterization of the composition of single EVs and thus convey a richer sense of EV heterogeneity (9). For this reason, we investigated several aspects of EV immobilization onto surfaces for imaging. We tested the direct adherence of EVs onto borosilicate glass and quartz coverslips, further probing the extent to which pre-coating with PLL enhances EV immobilization. We also examined mounting conditions for SRM imaging and determined that glass-immobilized EVs could also be used for cell interaction assays. We submit that these findings will be valuable for other investigators who wish to image immobilized EVs.

Materials and Methods

EV production: cell culture and transfection and EV separation

Using the Expi293™ expression system (Gibco #A14635), Expi293F cells were grown and transfected with the pLenti-palmGRET reporter plasmid (Addgene #158221) (10) following the manufacturer's instructions, as described previously (11). Three days after transfection, the cell suspension was centrifuged at $300 \times g$ for 5 min to remove cells from the conditioned medium. For Expi293F-palmGRET EV separation, the conditioned medium was centrifuged at $2,000 \times g$ for 20 min, filtered through a 0.22 μm bottle-top system (Corning), and concentrated

10X by tangential flow filtration (TFF, Vivaflow[®] 50R TFF cassettes, Sartorius). Samples were further concentrated 4X using ultrafiltration (Centricon Plus 70 Ultracel[®] PL-100, Merck Millipore; 4,000 × g, 20 min, RT) and eluted (1,500 × g, 2 min). Samples were separated into 11 fractions using size-exclusion chromatography (SEC; qEV10 70nm columns, IZON). EV-enriched fractions (1-4) were pooled and concentrated using Amicon 15 Ultra RC 10 kDa MWCO filters (Merck Millipore). Expi293F-palmGRET EV aliquots in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) were stored at 4 °C for short-term use and at -80 °C for long-term storage.

Western blotting

Expi293F-palmGRET cells were harvested and washed twice in DPBS (2,500 × g, 5 min, RT). The resulting pellet was lysed with RIPA buffer (Cell Signaling Technology #9806) for 1 h on ice, vortexing every 15 minutes. The cell lysate was centrifuged at 14,000 × g for 15 min at 4 °C to remove debris, and the supernatant was quantified using BCA protein assay (Thermo Scientific #23227). EV samples and SEC fractions (10 μl) were lysed with RIPA buffer for 10 min at room temperature. Samples were mixed with reducing (Thermo Scientific #39000) or non-reducing (Thermo Scientific #39001) sample buffer, boiled at 100 °C for 5 min, and loaded into Criterion TGX stain-free gels (4-15%; Bio-Rad #5678084) with a Spectra[™] Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher #26634). Gels ran in Tris/Glycine/SDS buffer (Bio-Rad #1610772) at constant voltage (100V) for 1.5 h, and stain-free gels were imaged on the Gel Doc EZ imager (Bio-Rad). Proteins were transferred to PVDF membranes (iBlot[™] 2 Transfer Stacks, Invitrogen #IB24001) on the iBlot[™] 2 Gel Transfer Device (Invitrogen) using a stacked program (20 V for 1 min; 23 V for 4 min, and 25 V for 2 min). Membranes were blocked with 5% milk-PBST for at least 1 h at room temperature under agitation and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C with orbital shaking. Membranes were probed for CD63 (1:3000, Ms, BD #556016), CD9 (1:3000, Ms, BioLegend #312102), syntenin (1:1000,

Rb, Abcam #133267) and calnexin (1:1000, Rb, Abcam #22595), washed four times with 5% milk-PBST for 5 min under agitation, and exposed to the appropriate secondary antibody (m-IgGκ BP-HRP, 1:5000, Santa Cruz #616102 or Mouse anti-Rb IgG HRP, 1:5000, Santa Cruz #2327) for 1 h, RT under agitation. Membranes were washed four times with PBST, exposed for 60 seconds to SuperSignal™ West Pico ECL substrate (Thermo Scientific #34578), and documented using the iBright 1500 (Invitrogen).

Flow nanoanalyzer

Expi293F-palmGRET EV preparations were measured for particle concentration, size distribution, and EGFP incidence (%) using a Flow NanoAnalyzer (NanoFCM Co., Ltd). System start-up included laser alignment and calibration with fluorescent 250 nm silica nanoparticles ($2.19\text{E}+10$ particles/ml, NanoFCM #QS2503) for particle concentration and a premixed silica nanosphere cocktail with monodisperse nanoparticle populations of 68 nm, 91 nm, 113 nm, and 155 nm in diameter (NanoFCM #516M-Exo) for size dispersion. Blank was set with DPBS as the vehicle. EV samples were diluted 1:1000 (v/v) in DPBS and boosted for 60 seconds before particle signal acquisition, using constant pressure of 1 kPa and event rates between 1,500 and 10,000 events/min. Signals for side-scattering and EGFP signal, particle concentration, and size dispersion were calculated using NanoFCM Professional Suite V2.0 software.

Transmission electron microscopy

Expi293F-palmGRET EV stock was diluted 1:20 (v/v) and adsorbed to glow-discharged carbon-coated 400 mesh copper grids by flotation for 2 min. Grids were quickly blotted and rinsed by flotation on three drops of Tris-buffered saline, 1 min each, before being negatively stained in two consecutive drops of 1% uranyl acetate (UAT) with tylose (1% UAT in deionized water (dH₂O), double filtered through a 0.22-μm filter). Grids were blotted and quickly aspirated to cover the sample with a thin layer of stain. Grids were imaged on a Hitachi 7600

transmission electron microscope (TEM) operating at 80 kV with an AMT XR80 CCD (8 megapixel), under magnification ranging from 30,000x to 120,000x.

Coverglass chamber preparation for EV immobilization

Schott D 263[®] coverglass chambers (μ -Slide 8 Well high Glass Bottom, ibidi #80807) were coated with 300 μ l of poly-L-lysine solution (0.1% PLL in H₂O (w/v), Sigma #P8920) and incubated overnight at 4 °C. The coating residue was removed through two washes with 500 μ l of DPBS (Gibco). Expi293F-palmGRET EVs (4E+08 particles/ml in DPBS, 300 μ l per well) were used to coat both PLL-coated and uncoated chambers and were incubated overnight at 4 °C and protected from light. The next day, wells were washed with DPBS twice (300 μ l per well) and filled with either 300 μ l of DPBS or 100 μ l of VECTASHIELD[®] mounting medium (Vector Laboratories #H-1000-10). Samples were stored at 4 °C until analysis. Three independent repeats with technical duplicates were done.

Coverslip preparation for EV immobilization

Borosilicate glass coverslips (Carolina Cover Glasses, Circle 12 mm, Thickness 0.13-0.17 mm, Carolina Science & Math #NC9537307) and quartz coverslips (\varnothing 10mm x 0.25mm thick, Ted Pella #26010) were rinsed with 70% ethanol and dried before use. Placed atop a 30 μ l drop of EV dilution (4E+08 particles/ml) on parafilm, coverslips were incubated overnight at 4 °C, protected from light. Coverslips were rinsed twice with DPBS and placed onto clear histological slides using VECTASHIELD[®] mounting medium. Slides were sealed (CoverGrip Coverslip Sealant, Biotium #23005) and stored at 4 °C until analysis. The experiment was conducted with two slips per group, in three independent repeats, using two distinct EV preparations.

Direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM)

A super-resolution microscopy system (Nanoimager, Oxford NanoImaging), coupled with NimOS software, was calibrated using beads detected using 405/473/532/635 nm laser

excitation, mounted atop a 100x oil-objective lens. Good quality channel mapping calibration was obtained through adequate point coverage. Coverslips and coverglass chambers were imaged in seven random sites ($79.28 \mu\text{m} \times 49.43 \mu\text{m}$) with 1000 frames at 30 ms exposure and 1.4 numerical aperture. Laser intensity was optimized for each sample. Post-acquisition spatial analysis was performed using CODI (alto.codi.bio), using the “clustering and counting” app for correcting drift, clustering populations, and counting particles. Widefield images were acquired under 1x zoom, and reconstituted images were snapped acquired under 6-8x zoom.

B cell isolation

Non-human primate blood samples were diluted (1:1, v/v) in Hank’s balanced salt solution (HBSS) and applied to SepMate™-15 (IVD) tubes loaded with a density gradient (Percoll®, Cytiva #17-0891-01). Blood was spun at $1,200 \times g$ for 10 min for separation into three phases, and the upper fraction, containing mononuclear cells (MNC), was transferred to fresh tubes and washed with HBSS. Cells were pelleted ($300 \times g$ for 8 min) and treated with red blood cell lysis buffer (ACK lysing buffer 0.83% NH_4Cl , 0.1% KHCO_3 , 0.03% EDTA) for 10 min at 37 °C. Cells were washed with HBSS, spun at $300 \times g$ for 8 min, and resuspended in cold selection buffer (PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA) mixed with 20% (v/v) CD20 MicroBeads (Miltenyi Biotec #130-091-104 and #130-042-201) for 15 min at 4 °C. The suspension was diluted in selection buffer, centrifuged at $300 \times g$ for 8 min, resuspended in buffer, and applied onto MS columns (Miltenyi Biotec #130-042-201) for magnetic cell sorting using MiniMACS™ separators (Miltenyi Biotec). $\text{CD}20^+$ B cells were collected in conical tubes, pelleted ($300 \times g$ for 8 min), and resuspended in RPMI 1640 + 10% FBS + 1% pen/strep for cell counting.

B cell adhesion to EV coating

Coverglass chambers (μ -Slide 8 Well high Glass Bottom, ibidi #80807) were coated with 300 μl poly-L-lysine (PLL, 0.1%, v/v) for 2 h at 4 °C and washed with DPBS (300 μl /well). An EV

suspension ($4E+08$ particles/ml in DPBS) was used to coat wells overnight at 4 °C, protected from light. Wells coated with 1% BSA-PBS (200 μ l/well) were used as the negative control. Excess coating was washed off with 300 μ l DPBS, and non-specific binding was blocked with 300 μ l 1% BSA-PBS in each well, followed by a 1-hour incubation at 37 °C. B cells ($1E+05$ cells in 300 μ l RPMI 1640 10% FBS) were applied to each well and incubated at 37 °C, 5% CO₂, for 1 h. Unbound cells were removed with three washes with DPBS (300 μ l per well) before fixation with 4% PFA for 10 min at RT. Cells were washed twice with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT, and washed again. F-actin was stained with Phalloidin-647 (200 μ l/well, 1:1000 dilution in PBS, Abcam #176759) for 1 h in the dark, and excess dye was washed off twice with PBS. Wells were coated with Prolong Mounting Medium with DAPI and sealed with parafilm for analysis using the Nanoimager (ONI). Cell count was assessed via nuclei count using FIJI (ImageJ), imaging a minimum of 6 random sites under 20x magnification using a confocal microscope (Zeiss 880 Airyscan FAST). The experiment was conducted on two independent occasions, using duplicated wells per group in each repeat.

Statistical analysis

Raw data were checked for outliers using the ROUT method (12), assuming a $Q = 0.1$. D'Agostino-Pearson omnibus K2 normality test was applied to identify data distribution. Parametric data were analyzed using unpaired t-test or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, and non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test. Statistical analysis and graphs were executed on GraphPad Prism (v. 10.0.1 (170)).

Results

Expi293F-palmGRET EV characterization

Expi293F cells were cultured to 720 ml of culture. Approximately 2.8×10^9 cells were transfected with pLenti-palmGRET EGFP-nanoluciferase reporter plasmid. Transfection efficiency was estimated under a fluorescent microscope equipped with a 488nm filter on the first and third days of transfection (Fig. 1A). Cells reached a population of approximately 3.8×10^9 cells after three days, at which time EV-containing conditioned culture medium was harvested and EVs were separated. Following the updated MISEV2023 guidelines (13), Expi293F-palmGRET EVs were characterized using multiple techniques. Volumetric Western blotting for proteins CD9, CD63, syntenin, and calnexin indicated the expected depletion of ER-specific calnexin and enrichment of EV-related syntenin and tetraspanins CD63 and CD9 in the early SEC fractions (Fig. 1B). Later SEC fractions were protein-enriched compared with EV fractions (Fig. 1C). EV-enriched fractions (1-4) were pooled for nanoflow analysis, revealing concentration of 4.7×10^{11} particles/ml, with 78.7% of particles being EGFP⁺ (Fig. 1D). EV size dispersion peaked at 76 nm (Fig. 1E). EVs were visualized with transmission electron microscopy (Fig. 1F) and super-resolution microscopy (Fig. 1G), showing expected size, morphology, and fluorescence.

Fig 1. Expi293F-palmGRET EV characterization (A) Fluorescence imaging of Expi293F cells tracking the three days of transient transfection with pLenti-palmGRET. Scale bar: 50 μ m. (B) Western blotting: membranes with Expi293F cell lysate and SEC fractions 1-11 were probed for calnexin (CANX), CD9, CD63, and Syntenin-1. (C) Quantification of protein content in SEC fractions 1-11. (D) Scatter plot of EV nanoflow cytometry, showing 78.7% EGFP-positivity amongst particles from the pooled SEC fractions 1-4. (E) Size distribution plot of Expi293F-palmGRET EVs by nanoflow cytometry. (F) Transmission electron microscopy. Scale bar: 100 nm. (G) Super-resolution microscopy image of a single EV particle emitting EGFP fluorescence. Scale bar: 50 nm.

EV immobilization is more efficient on glass than on quartz coverslips

Using the protocol depicted in Figure 2A, we found that both quartz and borosilicate glass can immobilize EVs. To count particles, each coverslip was imaged in at least six random sites in dSTORM, and the CODI software clustered signals from the multiple frames to identify individual EVs. Particle count detected 59.62 ± 17.67 on the quartz coverslip and 289.7 ± 172.3 clusters on the borosilicate glass coverslip, indicating a statistically significant difference in EV immobilization ($p < 0.0001$) (Fig. 2B). Inspection of the rendered images indicates the density of particles per frame (Fig. 2C).

Fig 2. EV immobilization on glass and quartz coverslips. (A) Experimental scheme for the preparation of EV-coated coverslips for SRM imaging. (B) Comparison of particle count between quartz and glass coverslips, obtained using the CODI software (alto.codi.bio). Non-parametric data was compared using the Mann-Whitney unpaired t-test, and the p -value is displayed on the graph. (C) Representative images of rendered dSTORM frames, showing individual Expi293F-palmGRET EVs in green, obtained at 60x magnification and 2x zoom. Scale bar: 20 μm .

EV immobilization is more uniform with PLL pre-coating

Using an 8-well culture chamber assembled atop a Schott D 263 borosilicate coverslip, we cross-examined the requirement of specific mounting medium and PLL to improve EV immobilization on glass. The experimental design for this assay is shown in Figure 3A. Regarding the requirement of mounting medium to stabilize the sample for imaging in SRM, we found a statistically significant difference between PBS *versus* mounting medium (MM) in glass surfaces only, but not in PLL-coated glass (Fig. 3B). This suggests PBS may be a viable medium for immersing samples in culture chambers for dSTORM, if used alongside PLL coating. We also found that EVs attached to borosilicate glass even without PLL coating (no PLL = 157.3 ± 144.9 clusters per site; PLL = 78.83 ± 45.26 clusters per site). However, although there were more EVs in the no PLL condition, high standard deviation (ranging from >50 to

300 particles per site) suggests that PLL facilitates a more uniform immobilization of EVs onto glass. Representative images of the rendered frames indicating the density of particles per site are shown in Fig. 3C.

Fig 3. EV immobilization onto borosilicate chamber coverglass. (A) Experimental scheme for the preparation of EV-coated chamber coverglasses for SRM imaging. (B) Comparison of particle count between uncoated wells or pre-coated with poly-L-lysine (0.1 mg/ml) prior to Expi293F-palmGRET EV immobilization and immersed in PBS or mounting medium (MM), obtained using the CODI software (alto.codi.bio). Non-parametric data were compared using the Kruskal-Wallis analysis of variance with Dunn's multiple comparison test, and the *p*-values are displayed on the graph. (C) Representative images of rendered dSTORM frames, showing individual Expi293F-palmGRET EVs in green, obtained at 60x magnification and 2x zoom. Scale bar: 20 μ m.

B cells interact with PLL/glass-immobilized EVs

We next performed a cell adhesion assay in which B-cells were allowed to interact with an EV-coated coverslip following a previous report (8). For this, we used PLL-coated glass coverslips and non-human primate (NHP) primary CD20⁺ B cells (Fig. 4A). An EV concentration of 4E+8 particles/ml was chosen from a dilution series (Fig. 4B) for subsequent comparison with a negative control (1% BSA-PBS). Although some cells bound to the negative control wells, on average 3.3-fold more cells adhered to EV-coated wells (Fig. 4C); binding of cells was also confirmed by SRM (Fig. 4D).

Fig 4. B-cells adhere to EV coating. (A) Experimental scheme. (B) Optimization of EV coating concentration, ranging from 1E+8 to 8E+8 particles/ml. Representative images from SRM rendering indicate Expi293F-palmGRET EVs in green and were obtained at 60x magnification and 2x zoom. Scale bar: 20 μ m. (C) Average count of attached cells in 1% BSA-PBS (negative control) and EV coating after 1h of incubation, obtained through nuclei counting. Non-parametric data was compared using the Mann-Whitney unpaired t-test and the *p*-value is

displayed on the graph. (D) Representative SRM images from the adhesion assay, showing EVs (green) and NHP B cells (red). Scale bar: 20 μm .

Discussion

Recently, a paper demonstrated that EV immobilization occurs similarly in quartz glass slides and positively charged quartz slides while describing a novel plugin for particle count using standard fluorescent microscopy images (9). We tested if similar results could be found between standard borosilicate glass coverslips and quartz coverslips, but instead using dSTORM to assess particle disposition. Using EGFP⁺ EVs, a significantly higher mobilization of EVs in glass coverslips rather than quartz was observed, suggesting that the use of commercially available glass coverslips is possible for assays in which EVs need to be adsorbed by an amorphous surface. We also found that the use of PLL coating in borosilicate glass is not required but aids the uniformity of EV distribution. We believe the PLL coating may contribute to EV binding in sites where the glass surface is not as homogeneous, by creating an electrostatic potential to improve EV adhesion (14). On a side note, we also found that mounting medium is not essential for SRM analysis, and PBS can be used as stable media to store microscopy samples under immersion for short periods. To the best of our knowledge, no studies so far have investigated whether PLL is required for EV immobilization on glass surfaces, and few have studied the interaction of EVs with different materials for functional assays.

Sample preparation for specific applications such as total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and dSTORM often require refined materials that improve their optical transmittance without compromising the roughness value on the surface or the chemical resistance (14). Quartz is considered a superior material for optical transmission, however, its high softening point (1,500 °C) creates a more delicate material and a costlier product (15). A

commercially available option is the standard glass coverslip, made from high-quality borosilicate glass with different sizes and thicknesses (e.g., 0.09 to 0.25 mm), which are suitable for microscopy, especially when treated with PLL in preparation for cell adhesion (16). EVs bind more efficiently to borosilicate glass than quartz, as found using dSTORM, suggesting that this material may be used for the development of new products focused on highly specific microscopy techniques.

Our findings suggest that the immobilization of EVs for highly specific imaging techniques may be achieved by using standard lab materials such as borosilicate glass coverslips. This simpler approach to dSTORM broadens the possibilities for methods and applications that can employ SRM. Also, coupled with the similarity between PBS and mounting medium to store the sample, we described a cheaper option for SRM preparation with equivalent results to costlier options.

Author's contribution

BCP: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing – original draft, writing – review and editing; BC: methodology, visualization; SEQ: methodology, visualization; HSSA: funding acquisition, supervision, writing – review and editing; KWW: conceptualization, funding acquisition, supervision, resources, writing – review and editing.

Acknowledgments

The authors thank members of the Witwer Laboratory, particularly Dr. Olesia Gobololova for consulting; the Retrovirus Laboratory; and the Biochemistry and Molecular Biology Laboratory for helpful suggestions and discussions.

Funding

This report was supported by the US National Institutes of Health through AI144997 (to KWW) and U42OD013117 (to EK Hutchinson), and by the São Paulo Research Foundation through grants 2019/05149-9, 2021/01983-4 and 2022/04146-9 (to BCP). The Witwer lab is also supported in part by NCI/Common Fund CA241694, NIMH MH118164, and the Richman Family Precision Medicine Center of Excellence in Alzheimer's Disease at Johns Hopkins University.

Conflict of interest

KWW is or has been an advisory board member of ShiftBio, Exopharm, NeuroDex, NovaDip, and ReNeuron; holds stock options with NeuroDex; and privately consults as Kenneth Witwer Consulting. Ionis Pharmaceuticals, Yuvan Research, and AgriSciX have sponsored or are sponsoring research in the Witwer laboratory.

References

1. Jimenez L, Yu H, McKenzie AJ, Franklin JL, Patton JG, Liu Q, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs. *J Proteome Res.* 2019 Mar 1;18(3):947–59.
2. Evtushenko EG, Bagrov DV, Lazarev VN, Livshits MA, Khomyakova E. Adsorption of extracellular vesicles onto the tube walls during storage in solution. *PLOS ONE.* 2020 Dec 28;15(12):e0243738.
3. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules.* 2014 Feb;19(2):1568–75.
4. Görgens A, Corso G, Hagey DW, Jawad Wiklander R, Gustafsson MO, Felldin U, et al. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *J Extracell Vesicles.* 2022 Jun;11(6):e12238.
5. Reynolds DE, Pan M, Yang J, Galanis G, Roh YH, Morales RTT, et al. Double Digital Assay for Single Extracellular Vesicle and Single Molecule Detection. *Advanced Science.* 2023;10(33):2303619.
6. Singh RK, Santos MF, Herndon C, Gieler BA, Lee I, Chen J, et al. Detection by super-resolution microscopy of viral proteins inside bloodborne extracellular vesicles. *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids.* 2023;4(4):557–67.
7. Yu C, Zhao W, Duan C, Xie J, Yin W. Poly-l-lysine-caused cell adhesion induces pyroptosis in THP-1 monocytes. *Open Life Sci.* 2022 Mar 24;17(1):279–83.
8. Altei WF, Pachane BC, dos Santos PK, Ribeiro LNM, Sung BH, Weaver AM, et al. Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin impairs adhesion and uptake of tumor-derived small extracellular

vesicles. *Cell Commun Signal*. 2020 Sep 25;18(1):158.

9. Schürz M, Danmayr J, Jaritsch M, Klinglmayr E, Benirschke HM, Matea C, et al. EVAnalyzer: High content imaging for rigorous characterisation of single extracellular vesicles using standard laboratory equipment and a new open-source ImageJ/Fiji plugin. *J Extracell Vesicles*. 2022 Dec;11(12):12282.
10. Wu AYT, Sung YC, Chen YJ, Chou STY, Guo V, Chien JCY, et al. Multiresolution Imaging Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer Identifies Distinct Biodistribution Profiles of Extracellular Vesicles and Exomeres with Redirected Tropism. *Advanced Science*. 2020;7(19):2001467.
11. Driedonks T, Jiang L, Carlson B, Han Z, Liu G, Queen SE, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of extracellular vesicles administered intravenously and intranasally to Macaca nemestrina. *Journal of Extracellular Biology*. 2022;1(10):e59.
12. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*. 2006 Mar 9;7(1):123.
13. Welsh JA, Goberdhan DCI, O’Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2024;13(2):e12404.
14. Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O, et al. Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol*. 2019 Jan;21(1):72–84.
15. Tang T, Yuan Y, Yalikun Y, Hosokawa Y, Li M, Tanaka Y, et al. Glass based Micro Total Analysis Systems: Materials, Fabrication methods, and Applications. *Sensors and Actuators B Chemical*. 2021 Mar 1;339.
16. Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 1975 Jul 1;66(1):198–200.

Figure 3

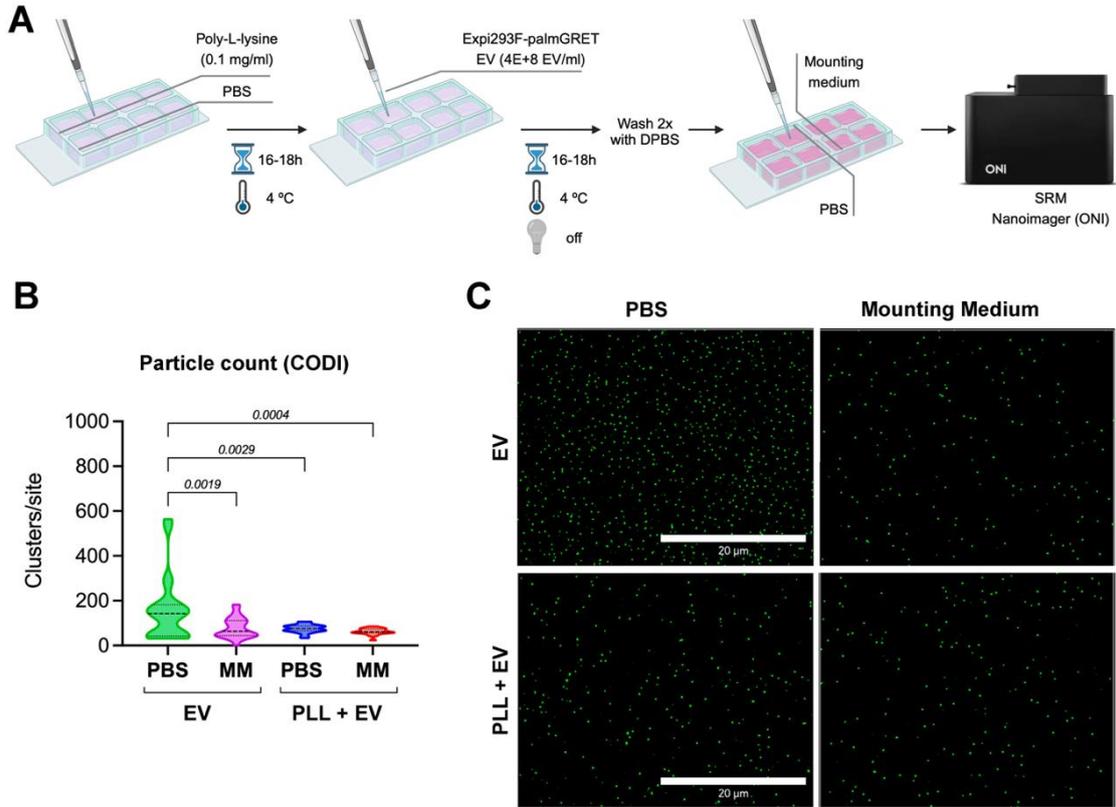
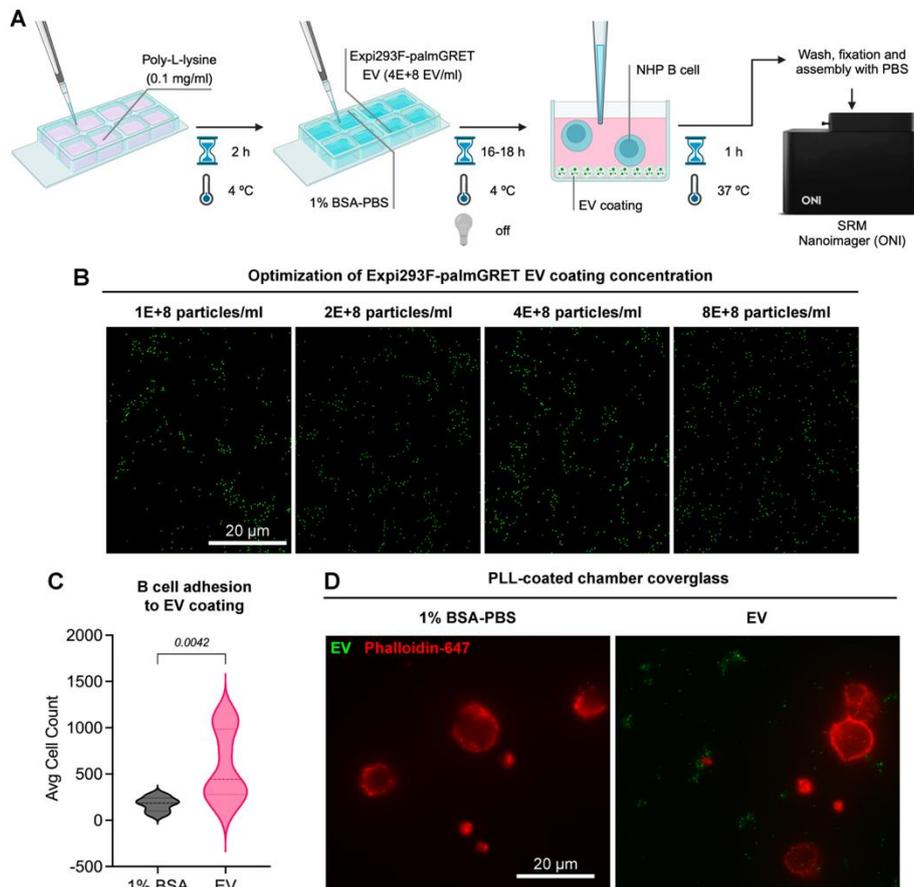


Figure 4





Article

Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion

Bianca Cruz Pachane ¹, Ana Carolina Caetano Nunes ¹, Thais Regiani Cataldi ², Kelli Cristina Micocci ³, Bianca Caruso Moreira ¹, Carlos Alberto Labate ², Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo ¹ and Wanessa Fernanda Altei ^{4,5,*}

¹ Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos—UFSCar, São Carlos 13565-905, SP, Brazil

² Max Feffer Plant Genetics Laboratory, Department of Genetics, University of São Paulo—ESALQ, Piracicaba 13418-900, SP, Brazil

³ Center for the Study of Social Insects, São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro 14884-900, SP, Brazil

⁴ Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, SP, Brazil

⁵ Radiation Oncology Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos 14784-400, SP, Brazil

* Correspondence: wanessa.altei@hospitaldeamor.com.br



Citation: Pachane, B.C.; Nunes, A.C.C.; Cataldi, T.R.; Micocci, K.C.; Moreira, B.C.; Labate, C.A.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Altei, W.F. Small Extracellular Vesicles from Hypoxic Triple-Negative Breast Cancer Cells Induce Oxygen-Dependent Cell Invasion. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12646. <https://doi.org/10.3390/ijms232012646>

Academic Editors: Michele Samaja and Giuseppina Milano

Received: 24 August 2022

Accepted: 13 October 2022

Published: 21 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Hypoxia, a condition of low oxygenation frequently found in triple-negative breast tumors (TNBC), promotes extracellular vesicle (EV) secretion and favors cell invasion, a complex process in which cell morphology is altered, dynamic focal adhesion spots are created, and ECM is remodeled. Here, we investigated the invasive properties triggered by TNBC-derived hypoxic small EV (SEVh) in vitro in cells cultured under hypoxic (1% O₂) and normoxic (20% O₂) conditions, using phenotypical and proteomic approaches. SEVh characterization demonstrated increased protein abundance and diversity over normoxic SEV (SEVn), with enrichment in pro-invasive pathways. In normoxic cells, SEVh promotes invasive behavior through pro-migratory morphology, invadopodia development, ECM degradation, and matrix metalloprotease (MMP) secretion. The proteome profiling of 20% O₂-cultured cells exposed to SEVh determined enrichment in metabolic processes and cell cycles, modulating cell health to escape apoptotic pathways. In hypoxia, SEVh was responsible for proteolytic and catabolic pathway inducement, interfering with integrin availability and gelatinase expression. Overall, our results demonstrate the importance of hypoxic signaling via SEV in tumors for the early establishment of metastasis.

Keywords: hypoxia; extracellular vesicles; breast cancer; cell invasion

1. Introduction

Low oxygen tissue perfusion, or hypoxia, is established in most solid tumors as a consequence of cell proliferation, increased tumor mass, and abnormal tumor vascularization [1]. Oxygen depletion, either acute, intermittent, or continuous, inhibits the ubiquitination of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), whose accumulation triggers the transcription regulation of genes involved in survival, angiogenesis, invasiveness, stemness, and resistance to chemotherapy [2–5]. These responses are often upregulated in both primary and metastatic breast adenocarcinomas, impairing overall patient survival and successful therapeutics [6,7].

Tumor cells have increased extracellular vesicle (EV) secretion, which enables intercellular communication by stably transferring biomolecules between different compartments [8,9]. In triple-negative breast cancer (TNBC), a highly aggressive breast cancer subtype that lacks receptors for estrogen (ER-), progesterone (PR-), and HER2 [8,10], normoxia-produced EVs have been highlighted in aiding pro-tumoral responses such

Review

The Role of $\alpha v \beta 3$ Integrin in Cancer Therapy Resistance

Bianca Cruz Pachane ^{1,2} and Heloisa S. Selistre-de-Araujo ^{1,*}

¹ Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos 13565-905, SP, Brazil; bpachane@estudante.ufscar.br

² Department of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

* Correspondence: hselistre@ufscar.br

Abstract: A relevant challenge for the treatment of patients with neoplasia is the development of resistance to chemo-, immune-, and radiotherapies. Although the causes of therapy resistance are poorly understood, evidence suggests it relies on compensatory mechanisms that cells develop to replace specific intracellular signaling that should be inactive after pharmacological inhibition. One such mechanism involves integrins, membrane receptors that connect cells to the extracellular matrix and have a crucial role in cell migration. The blockage of one specific type of integrin is frequently compensated by the overexpression of another integrin dimer, generally supporting cell adhesion and migration. In particular, integrin $\alpha v \beta 3$ is a key receptor involved in tumor resistance to treatments with tyrosine kinase inhibitors, immune checkpoint inhibitors, and radiotherapy; however, the specific inhibition of the $\alpha v \beta 3$ integrin is not enough to avoid tumor relapse. Here, we review the role of integrin $\alpha v \beta 3$ in tumor resistance to therapy and the mechanisms that have been proposed thus far. Despite our focus on the $\alpha v \beta 3$ integrin, it is important to note that other integrins have also been implicated in drug resistance and that the collaborative action between these receptors should not be neglected.

Keywords: tumor resistance; integrins; $\alpha v \beta 3$ integrin; tyrosine kinase inhibitors; immune checkpoint inhibitors; radiotherapy resistance



Citation: Pachane, B.C.;

Selistre-de-Araujo, H.S. The Role of $\alpha v \beta 3$ Integrin in Cancer Therapy Resistance. *Biomedicines* 2024, 12, 1163. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061163>

Academic Editors: Fernando de Carvalho da Silva, Bruno Kaufmann Robbs and Gabriela Nestal De Moraes

Received: 24 July 2023

Revised: 16 August 2023

Accepted: 21 May 2024

Published: 24 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The development of therapy resistance in cancer patients is a reoccurring and concerning issue in clinics, arising as a consequence of multifaceted events that involve both external and intrinsic components ranging from therapeutic pressure to tumor burden, heterogeneity, and disease progression. Due to this challenge in treatment, it is common that throughout cancer development patients are exposed to different types of drugs, with or without combination with other compounds and treatment settings, in varying dosages. This aggressive approach can be modulated as the patient response is observed, until a point where the illness has either been cured, has plateaued, or has aggravated [1]. Luckily, the methods for cancer treatment have evolved in such a way that recurrent tumors have become less frequent, yet certain types of cancer remain with a high index of recurrence and mortality. For example, patients in a clinical trial from Iran with recurrent glioblastoma had a median overall survival of 16 months [2]. In the Netherlands, a multicenter cohort study has found that 42% of patients proceeded to develop recurrent colon cancer in the five years following up remission [3].

Recurrent cancer can be developed locally (i.e., in the same tissue), regionally (i.e., in adjacent tissues), or distantly from the primary site, and some types of cancers have a tropism to metastasize towards specific tissues, as is the case in breast-to-bone cancer [4,5]. It is also known that recurrent tumors may not present characteristics similar to the original mass; therefore, their treatment needs to be adjusted to target the new neoplastic microenvironment [6]. Hence, understanding how tumor progression

ANEXO D – Proteoma Diferencial de MDA-MB-231

Code	Protein Name	f value	p value	- log10(p)	FDR	Tukey's HSD
RPAB1	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	2900.1	1.75E-12	11.756	4.58E-09	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
NPL4	Nuclear protein localization protein 4 homolog	1353.2	3.68E-11	10.434	4.81E-08	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
KT3K	Ketosamine-3-kinase	965.53	1.41E-10	9.849	1.23E-07	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
MRM3	rRNA methyltransferase 3, mitochondrial	746.72	3.94E-10	9.405	2.58E-07	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
ADDA	Alpha-adducin	681.92	5.66E-10	9.247	2.96E-07	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GDE	Glycogen debranching enzyme	576.74	1.10E-09	8.958	4.80E-07	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
GMPR1	GMP reductase 1	357.98	7.33E-09	8.135	2.60E-06	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
BAG6	Large proline-rich protein BAG6	349.14	8.10E-09	8.092	2.60E-06	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
SETD7	Histone-lysine N-methyltransferase SETD7	335.79	9.45E-09	8.024	2.60E-06	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
GCP2	Gamma-tubulin complex component 2	331.61	9.93E-09	8.003	2.60E-06	SEVh-N x PBS-H SEVh-N x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CL029	Uncharacterized protein C12orf29	265.05	2.41E-08	7.617	5.74E-06	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
KAD4	Adenylate kinase 4, mitochondrial	196.9	7.80E-08	7.108	1.70E-05	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
AEDO	2-aminoethanethiol dioxygenase	165.23	1.56E-07	6.808	3.07E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
LYRM7	Complex III assembly factor LYRM7	162.91	1.64E-07	6.784	3.07E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
HSP72	Heat shock-related 70 kDa protein 2	153.85	2.06E-07	6.686	3.51E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
PAPS1	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	152.18	2.15E-07	6.668	3.51E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
EPS15	Epidermal growth factor receptor substrate 15	148.61	2.36E-07	6.627	3.63E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
RBX1	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1	144.55	2.63E-07	6.580	3.82E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	<i>f</i> value	<i>p</i> value	$-\log_{10}(p)$	FDR	Tukey's HSD
FBX50	F-box only protein 50	112.57	6.99E-07	6.156	9.62E-05	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
BABA1	BRISC and BRCA1-A complex member 1	104.13	9.47E-07	6.024	1.24E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
TES	Testin	95.909	1.30E-06	5.885	1.61E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GBRL2	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	94.916	1.36E-06	5.867	1.61E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
KPRB	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	88.195	1.80E-06	5.744	1.93E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
GSTT2; GST2	Glutathione S-transferase theta-2B; Glutathione S-transferase theta-2	87.837	1.83E-06	5.737	1.93E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5	87.735	1.84E-06	5.735	1.93E-04	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
DDX23	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	86.176	1.97E-06	5.705	1.98E-04	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
COA6	Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	82.576	2.33E-06	5.633	2.25E-04	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
BID	BH3-interacting domain death agonist	79.736	2.66E-06	5.575	2.46E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
P4HA2	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	79.284	2.72E-06	5.565	2.46E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CSRP2	Cysteine and glycine-rich protein 2	74.86	3.40E-06	5.469	2.92E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
NEUA	N-acylneuraminate cytidyltransferase	74.487	3.46E-06	5.461	2.92E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
DBR1	Lariat debranching enzyme	73.861	3.58E-06	5.446	2.92E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
PORIM	Porimin	63.112	6.54E-06	5.185	5.18E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CYTC	Cystatin-C	62.636	6.73E-06	5.172	5.18E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	f value	p value	- log ₁₀ (p)	FDR	Tukey's HSD
CKAP2	Cytoskeleton-associated protein 2	61.221	7.34E-06	5.134	5.49E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
SNX12	Sorting nexin-12	58.753	8.59E-06	5.066	6.19E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
CGL	Cystathionine gamma-lyase	58.069	8.98E-06	5.047	6.19E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
ACYP1	Acylphosphatase-1	58.043	9.00E-06	5.046	6.19E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CD47	Leukocyte surface antigen CD47	57.592	9.27E-06	5.033	6.22E-04	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
ATG3	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	57.135	9.55E-06	5.020	6.25E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
KITH	Thymidine kinase, cytosolic	55.105	1.10E-05	4.960	6.99E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
SRRT	Serrate RNA effector molecule homolog	54.119	1.17E-05	4.930	7.31E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
PCY2	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	52.442	1.32E-05	4.879	7.95E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
FKBP9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	52.28	1.34E-05	4.873	7.95E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
PPCEL	Prolyl endopeptidase-like	51.713	1.39E-05	4.856	8.11E-04	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
PAPS2	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	47.31	1.95E-05	4.710	1.11E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
PP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	46.568	2.07E-05	4.684	1.15E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GAL3B; GAL3A	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3, mitochondrial; Putative glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 3B, mitochondrial	40.451	3.51E-05	4.455	1.91E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
HBE	Hemoglobin subunit epsilon	39.618	3.79E-05	4.421	2.02E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
CHSP1	Calcium-regulated heat-stable protein 1	38.468	4.23E-05	4.373	2.21E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	<i>f</i> value	<i>p</i> value	- log ₁₀ (<i>p</i>)	FDR	Tukey's HSD
YLPM1	YLP motif-containing protein 1	33.801	6.83E-05	4.166	3.50E-03	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GALK1	Galactokinase	32.469	7.91E-05	4.102	3.98E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
PICAL	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	29.018	1.19E-04	3.924	5.88E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
STABP	STAM-binding protein	28.388	1.29E-04	3.889	6.25E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GORS2	Golgi reassembly-stacking protein 2	26.761	1.60E-04	3.796	7.60E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GTR3; GTR14	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3; Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14	25.888	1.80E-04	3.745	8.41E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
RPB9	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	25.742	1.84E-04	3.736	8.43E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
KNTC1	Kinetochores-associated protein 1	25.62	1.87E-04	3.728	8.43E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
ANLN	Anillin	25.319	1.95E-04	3.710	8.64E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
TAGL	Transgelin	24.388	2.23E-04	3.652	9.72E-03	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
ZN638	Zinc finger protein 638	24.009	2.36E-04	3.628	9.99E-03	SEVh-N x PBS-H SEVh-N x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CHCH2; CHCH9	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2; Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial	23.975	2.37E-04	3.625	9.99E-03	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
ERO1A	ERO1-like protein alpha	23.765	2.44E-04	3.612	1.01E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
BAF	Barrier-to-autointegration factor	23.567	2.52E-04	3.599	1.03E-02	SEVh-N x PBS-H SEVh-N x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
OSBP1	Oxysterol-binding protein 1	22.995	2.75E-04	3.561	1.11E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
CNPY3	Protein canopy homolog 3	22.488	2.97E-04	3.527	1.17E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	f value	p value	- log10(p)	FDR	Tukey's HSD
CARM1	Histone-arginine methyltransferase CARM1	22.373	3.03E-04	3.519	1.17E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	22.317	3.05E-04	3.515	1.17E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
HAT1	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	22.065	3.18E-04	3.498	1.20E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
IDI1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	21.991	3.22E-04	3.493	1.20E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	21.789	3.32E-04	3.478	1.22E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
DNM1L	Dynamin-1-like protein	21.661	3.39E-04	3.469	1.23E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
TF65	Transcription factor p65	21.325	3.58E-04	3.446	1.28E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
TOPK	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase	21.272	3.62E-04	3.442	1.28E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
HPF1	Histone PARylation factor 1	20.788	3.92E-04	3.407	1.35E-02	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	20.767	3.93E-04	3.405	1.35E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
IPP2; IPP2B	Protein phosphatase inhibitor 2; Protein phosphatase inhibitor 2 family member B	20.638	4.02E-04	3.396	1.37E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
SAP18	Histone deacetylase complex subunit SAP18	19.968	4.51E-04	3.346	1.51E-02	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
RL26	60S ribosomal protein L26	19.904	4.56E-04	3.341	1.51E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	19.478	4.92E-04	3.308	1.61E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
H12	Histone H1.2	18.579	5.79E-04	3.237	1.87E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
MD2L1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	17.398	7.26E-04	3.139	2.31E-02	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	f value	p value	- log10(p)	FDR	Tukey's HSD
TBB2A	Tubulin beta-2A chain	16.957	7.92E-04	3.101	2.46E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
GSH1	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	16.924	7.97E-04	3.098	2.46E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
ACO13	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	16.919	7.98E-04	3.098	2.46E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
AIP	AH receptor-interacting protein	16.711	8.33E-04	3.080	2.53E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
PQBP1	Polyglutamine-binding protein 1	16.431	8.82E-04	3.055	2.65E-02	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
NDRG1	Protein NDRG1	16.27	9.12E-04	3.040	2.71E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
DSC1	Desmocollin-1	16.051	9.54E-04	3.020	2.80E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
F107B	Protein FAM107B	15.403	1.10E-03	2.960	3.15E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
MUCL1	Mucin-like protein 1	15.397	1.10E-03	2.960	3.15E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-H
PDIA1	Protein disulfide-isomerase	15.129	1.16E-03	2.934	3.31E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N
SRP68	Signal recognition particle subunit SRP68	14.926	1.22E-03	2.914	3.42E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
COASY	Bifunctional coenzyme A synthase	14.79	1.26E-03	2.901	3.49E-02	SEVh-H x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
BPNT1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	14.572	1.32E-03	2.880	3.63E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-H SEVh-N x PBS-N
RL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	14.084	1.48E-03	2.831	4.02E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
UBR7	Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7	13.988	1.51E-03	2.821	4.07E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x PBS-N
ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	13.848	1.56E-03	2.807	4.17E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N SEVh-N x SEVh-H
NQO2	Ribosylidihyronicotinamide dehydrogenase [quinone]	13.381	1.75E-03	2.758	4.62E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-H x PBS-N

Proteoma Diferencial de MDA-MB-231 (continuação)

Code	Protein Name	f value	p value	- log₁₀(p)	FDR	Tukey's HSD
UBP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	13.046	1.90E-03	2.722	4.96E-02	PBS-N x PBS-H SEVh-N x PBS-H SEVh-N x SEVh-H

Legenda: *Tukey's HSD: Tukey's honest significant difference.* FONTE: Pachane *et al.*, 2022.