



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeito de vesículas extracelulares e *cell free* DNA de pacientes com câncer de próstata em células normais prostáticas.

Aluna: Aline Gomes de Souza

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador (a): Dr^a Karina Marangoni

UBERLÂNDIA - MG
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeito de vesículas extracelulares e *cell free* DNA de pacientes com câncer de próstata em células normais prostáticas.

Aluna: Aline Gomes de Souza

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Vivian Alonso Goulart

Co-Orientador (a): Dr^a Karina Marangoni

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA – MG
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S729
2019

Souza, Aline Gomes de, 1989-
Efeito de vesículas extracelulares e cell free dna de
pacientes com câncer de próstata em células normais
prostáticas [recurso eletrônico] / Aline Gomes de Souza. -
2019.

Orientador: Vivian Alonso Goulart.
Coorientador: Karina Marangoni.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.
Disponível em: [http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.
2019.2146](http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2146)

Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Goulart, Vivian Alonso , 1969-, (Orient.). II.
Marangoni, Karina , 1980-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 06/2019 - PPGGB				
Data:	15 de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:15h
Matrícula do Discente:	11523GBI0001				
Nome do Discente:	Aline Gomes de Souza				
Título do Trabalho:	Efeito de vesículas extracelulares e <i>cell free</i> DNA de pacientes com câncer de próstata em células normais prostáticas.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INCT em teranóstica e nanobiotecnologia.				

Aos quinze dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Ferro Leal, Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Tieme Fujimura, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Silva Siquieroli e Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata: APROVADA. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Presidente**, em 15/07/2019, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Silva Siquieroli, Membro de Comissão**, em 15/07/2019, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/07/2019, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Ferro Leal, Usuário Externo**, em 15/07/2019, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Tiemi Fujimura, Usuário Externo**, em 15/07/2019, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1396428** e o código CRC **28C886A1**.

Sempre foi Deus!

Dedicatória

**Dedico este trabalho aos pacientes com
câncer de próstata do HC-UFU, que
gentilmente doaram um pouco de si.**

Agradecimentos

Ao longo da vida sempre há pessoas que nos ajudam, e sem as quais nossos sonhos seriam dificilmente alcançados...

Agradeço a Deus por abençoar e conduzir todos os meus dias; por ser minha força, meu amparo, meu amigo!

Agradeço a minha família, em especial meus pais e irmãos, meus maiores exemplos, agradeço pelo apoio e amor em todos os momentos;

A minha orientadora Prof^a Dr^a Vivian Alonso Goulart, agradeço por ter-me deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa durante estes 8 anos, também pelo aprendizado, incentivo, carinho e, pela valiosa oportunidade de realizar este trabalho;

A minha co-orientadora Dr^a Karina Marangoni, agradeço pelo aprendizado, pela amizade e estímulo ao longo dessa caminhada;

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela oportunidade de executar meu trabalho no Laboratório de Nanobiotecnologia, que coordena com excelência.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Carlos Ueira Vieira, Dr^a. Ana Carolina Siquieroli, Dr^a. Letícia Ferro Leal, Dr^a. Patricia Tieme Fujimura, agradeço pela disponibilidade em participar na avaliação deste trabalho;

Ao Victor Alexandre, agradeço pelo companheirismo e carinho. Sua presença, com certeza, foi e é muito especial em meus dias;

Agradeço as queridas amigas Emília, Jéssica Souza, Izabella (Isadorinha) e Hebréia pela amizade diária, pela alegria e companhia ao longo desta etapa. Foram muitos os momentos de descontração e boas risadas, a amizade e apoio de vocês tornou essa caminhada mais leve e feliz;

As amigas Patrícia Terra, Larissa, Roberta, Antoniele, Gabriela, Patrícia Silva, agradeço pelo apoio, conversas, brincadeiras e amizade;

A Patrícia Tieme, agradeço por ser uma amiga tão especial, mesmo longe fisicamente, se mantém por perto com sua generosidade, carinho e atenção;

Agradeço a Jéssica Regina, amiga de longa data. Juntas encerramos mais uma etapa, que aliás começamos juntas. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontrações, pelos pedidos de açaí e pelos chocolates, e claro pelas leituras de artigos! Que essa amizade que completa uma década, complete tantas outras;

A Mariana Carrijo e Laiane Kálita, agradeço pela amizade e carinho, mesmo longe sempre mantivemos unidas e presentes na vida uma da outra;

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo de estudo em Oncologia Molecular: Esther, Lorraine, Carolina, Letícia Barcelos e Isaura pela amizade e pelo aprendizado;

Ao Mário agradeço pela paciência e ajuda com os dados da metabolômica;

Ao Laboratório de Quimiometria do Triângulo da Universidade Federal de Uberlândia, agradeço pela ajuda com as análises quimiométricas;

A Luciana e Natássia pelo carinho, amizade e pelo zelo com o Laboratório de Nanobiotecnologia;

Aos integrantes do Laboratório de Genética, agradeço pela amizade, carinho e alegria durante minhas visitas. Em especial, Serena, pela sua alegria e sinceridade, Tamiris e Luiza pelo carinho;

A Janaína, secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, pela atenção e carinho;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e a Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino e pesquisa de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento do Projeto.

E a todos aqueles que estiveram presentes nesta caminhada, com certeza ela não seria a mesma sem vocês.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Câncer de próstata	1
1.2.	Carcinogênese e transição epitélio mesenquimal	2
1.3.	Biópsia Líquida	5
1.3.1.	Vesículas Extracelulares	5
1.3.2.	<i>Cell Free</i> DNA no câncer	10
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivos Gerais	13
2.2.	Objetivos específicos	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1.	Análises com VE	14
3.1.1.	Coleta da amostra biológica	14
3.1.2.	Cultura primária das biópsias	15
3.1.3.	Isolamento das VE do meio condicionado	15
3.1.4.	Isolamento das VE do plasma	16
3.1.5.	Lise das VE e quantificação do conteúdo proteico	16
3.1.6.	Análise morfológica e tamanho das VE por MEV	17
3.1.7.	Marcação das VE	17
3.1.8.	Cultura de linhagens celulares	18
3.1.9.	Avaliação da internalização das VE pelas células da próstata	18
3.1.10.	Ensaio de migração celular	19
3.1.11.	Ensaio de proliferação celular	19
3.1.12.	Extração de RNA	19
3.1.13.	qPCR	20
3.2.	Análises com cfDNA	22
3.2.1.	Coleta das amostras biológicas para análise de cfDNA	22
3.2.2.	Isolamento de cfDNA do plasma	23

3.2.3. Análise do tamanho dos fragmentos de cfDNA.....	24
3.2.4. Quantificação do cfDNA	24
3.2.5. Cultura de linhagens celulares	25
3.2.6. Preparo dos <i>pools</i> de cfDNA.....	25
3.2.7. Tratamento das linhagens celulares com cfDNA.....	25
3.2.8. Extração de RNA total.....	25
3.2.9. qPCR.....	26
3.2.10. Metabolômica.....	26
3.2.10.1. Preparo das amostras para metabolômica.....	26
3.2.10.2. Análise IES/EM por infusão direta	27
3.2.10.3. Análise quimiométrica	27
3.2.10.4. EM e EM/EM para identificação dos metabólitos	28
3.3. Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Análises com VE	30
4.1.1. Caracterização do tamanho e avaliação da internalização das VE	30
4.1.2. Análises funcionais das VE	32
4.2. Análises com cfDNA	36
4.2.1. Caracterização e quantificação do cfDNA	36
4.2.2. Análise funcional do cfDNA	38
4.2.3. Análise Metabolômica.....	39
4.2.4. Análise de Quimiometria	42
4.2.4.1. Análise modo negativo PNT-2.....	42
4.2.4.2. Análise modo positivo RWPE-1	42
4.2.5. Identificação dos metabólitos.....	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais causas de morte entre homens no mundo e pouco se conhece sobre seu desenvolvimento e metástase. Assim, novas abordagens têm sido propostas para obtenção de uma melhor qualidade de vida para os pacientes. Dentre essas abordagens a biópsia líquida tem se destacado, por ser uma prática menos invasiva que a biópsia tecidual. Nessa situação, células tumorais, vesículas extracelulares e fragmentos de DNA circulantes são utilizados para triagem do câncer a partir de diferentes fluidos biológicos. Em adição, podem participar de eventos pró tumorais como transformação maligna das células adjacente ao tumor e na metástase. Diante disso, esse trabalho buscou analisar o efeito das vesículas extracelulares e do DNA circulante, derivados de pacientes com câncer de próstata, em linhagens celulares normais da próstata após serem tratadas por 24 h. Para isso, foram realizados previamente ensaios de caracterização destas moléculas e em seguida, ensaios funcionais como: migração e proliferação celular, expressão gênica e metabólica. Esta última foi realizada também na intenção de verificar a presença de potenciais biomarcadores secretados pelas células normais em resposta a presença de DNA tumoral circulante. Os resultados obtidos mostraram que vesículas extracelulares derivadas de pacientes com CaP podem alterar o perfil de expressão de genes relacionados a progressão do CaP e ao processo de transição epitélio mesenquimal, muito abordado na metástase do câncer, além de aumentar a proliferação e a migração celular. O DNA circulante isolado de pacientes com CaP também mostrou ser capaz de induzir alterações na expressão gênica em células normais, alterando também o perfil de metabólitos secretados por essas células. Baseado na concentração do cfDNA indivíduos saudáveis foram distinguidos de pacientes com CaP com uma sensibilidade de 72% e especificidade de 71%. Esses dados confirmam, portanto, a participação de VE e cfDNA, isolados de pacientes com CaP, em eventos celulares cruciais para o desenvolvimento e progressão da doença, além de demonstrar o potencial de VE e cfDNA para serem empregados no diagnóstico e como alvos terapêuticos em futuros tratamentos do câncer.

Palavras-chave: biópsia líquida, comunicação celular, transformação maligna, metabólica,

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is one of the major causes of death among men worldwide, and little is known about the disease development and the metastasis process. New clinical approaches have been proposed, aiming to improve the quality of life of prostate cancer patients. Amongst various approaches, liquid biopsies have been distinguished from other techniques, by being less invasive than tissue biopsies. In this technique, tumor cells, extracellular vesicles and circulating DNA fragments can be identified in various biological fluids and used for screening. In addition to their use in the prostate cancer diagnosis, circulating tumor cells, vesicles and DNA, can play a role in pro-tumor events, as the malignant transformation of adjacent cells or in the metastasis process. Based on that information, this work aimed to evaluate the effect of prostate tumor derived extracellular vesicles and circulating DNA in normal prostate cell lines upon 24 h treatment. To this end, we first characterized those molecules, then functional assays were performed, such as cell migration and proliferation, gene expression and metabolomics. Metabolomic analysis was also performed in hope to identify potential biomarkers secreted by normal cells in response to the treatment with circulating tumor DNA. Results demonstrate that extracellular vesicles derived of PCa patients can alter the expression profile of PCa related genes and epithelial mesenchymal transition genes. Increase in cell proliferation and migration was also observed after treatment. Circulating DNA isolated from PCa patients were also capable to alter the gene expression of normal cells, altering as well their metabolic profile. In addition, concentration of cfDNA could separate health individuals and PCa patients with a sensibility of 72% and specificity of 71%. Those data confirm the role of EV and cfDNA derived from PCa patients in malignant cellular events, crucial to the development and progression of the PCa. Furthermore, we demonstrated the potential of EV and cfDNA as diagnostic and therapeutic targets.

KEYWORDS: liquid biopsy, cellular communication, malignant transformation, metabolomics.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

O câncer de próstata (CaP) é um dos tumores mais prevalentes entre a população masculina. Na fase inicial é caracterizado como uma doença lentamente progressiva (STEWART et al., 2017). A maioria dos pacientes não apresentam nenhum sintoma, e quando apresentam, são sintomas comuns ou parecidos com o crescimento benigno da próstata (hiperplasia benigna da próstata - HPB), tais como dificuldade para urinar, retenção urinária e noctúria. Enquanto que, na fase avançada, o paciente pode apresentar dor óssea, infecção generalizada ou mesmo insuficiência renal (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017).

De acordo com o estadiamento, os pacientes diagnosticados com CaP podem apresentar sobrevida diferentes. O sistema de estadiamento mais utilizado é denominado Sistema TNM de classificação dos tumores malignos, preconizado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC) (UICC, 2004).

Nesse sistema são considerados as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos próximos ao órgão em que o tumor se encontra (N), e também a presença ou ausência de metástases a distância (M). A classificação desses parâmetros recebe graduações, normalmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1. Além dessas graduações numéricas, pode também ser adicionado graduações alfabéticas (a, b, c). Ambas as formas de graduação são para expressar o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos (CHALLACOMBE; ROTTENBERG, 2013).

Em relação a triagem do CaP, as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico são o toque retal e a avaliação dos níveis séricos do antígeno prostático específico (PSA). No entanto, a realização da biópsia prostática é obrigatória para um diagnóstico final da doença (RIGAU et al., 2013), já que a avaliação por PSA é ainda limitante na detecção efetiva do CaP, como também não é capaz de diferenciar pacientes com CaP agressivo daqueles com a doença indolente. Além disso, os níveis de PSA podem ser afetados por vários outros fatores como idade, prostatite, infecção do trato urinário e hiperplasia da próstata, o que promove,

Inevitavelmente, a resultados falso-positivos (LINK et al., 2004, DIMAKAKOS; ARMAKOLAS; KOUTSILIERIS, 2014).

A análise da biópsia também pode, todavia, fornecer resultados falso-negativos em situações quando o tumor é pequeno; quando as células cancerígenas são distribuídas de forma heterogênea ou se o CaP estiver em fase inicial (ANDRIOLE et al., 2012). Assim, amostras obtidas durante a biópsia para análise histopatológica podem não ser representativas do câncer (UKIMURA et al., 2013).

Diante disso, há uma necessidade evidente da busca de biomarcadores consistentes para o diagnóstico e monitoramento do CaP, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (DIMAKAKOS; ARMAKOLAS; KOUTSILIERIS, 2014). Eventos biológicos relacionados ao desenvolvimento e a progressão do CaP precisam ser melhor compreendidos, bem como, o mecanismo de ação das diferentes moléculas presentes no microambiente celular que participam de processos tumorais ligados a carcinogênese (BERGER et al., 2011; CHAFFER; WEINBERG, 2011).

1.2. Carcinogênese e transição epitélio mesenquimal

O termo carcinogênese é conhecido como um processo celular que envolve múltiplos estágios, envolvendo alterações genéticas e epigenéticas decorrentes por exemplo, de mudanças ambientais e estilo de vida (SHARMA; KELLY; JONES, 2009). Dentre os principais estágios que envolvem a carcinogênese se destacam a iniciação, a promoção e a progressão. Estes estágios estão inseridos dentro de uma cascata de diferentes eventos celulares que ocorrem durante a transformação maligna e refletem parte do processo oncogênico (POTTER, 1980, PITOT, 1993).

A iniciação, sendo o primeiro estágio da carcinogênese, caracteriza-se pela fase em que as células sofrem mutações a partir da exposição e ação de agentes carcinógenos que alteram a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA). Os principais agentes carcinógenos são os compostos químicos, raios X ou ultravioleta e vírus, OLIVEIRA et al., 2007). Muitos mecanismos celulares podem ser

acionados para reparar o dano/mutação causado na célula neste estágio, ou então, se dará o próximo estágio da carcinogênese que é a promoção.

Na promoção as células geneticamente alteradas, que passaram pela iniciação, sofrem a ação de oncopromotores transformando-se em células malignas (YOKOTA, 2000). No entanto, para que a transformação aconteça é fundamental um contato contínuo e prolongado com o agente cancerígeno promotor, caso contrário o processo pode ser revertido (KASTAN; BARTEK, 2004).

No terceiro estágio o câncer já está instalado e se caracteriza pelas alterações moleculares adicionais, multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas e conseqüente, aumento da massa tumoral primária. Além disso, pode ocorrer o desprendimento de células do tumor e sua circulação em direção a outros tecidos, provocando a metástase (JOYCE; POLLARD, 2009; ALBERTS et al., 2010).

Durante o desenvolvimento de todos os estágios da carcinogênese, a comunicação celular é primordial para que as células malignas consigam se estabelecer, desenvolver e colonizar os tecidos, bem como driblar o sistema imunológico. Desta forma, alguns processos celulares são necessários para que aconteça a progressão do câncer e a disseminação da metástase (GEIGER; PEEPER, 2009).

A transição epitélio mesenquimal (TEM) é um importante exemplo de tais processos celulares. A TEM se refere a um processo biológico no qual uma célula epitelial, que normalmente interage com a membrana basal por meio da superfície basal, sofre múltiplas alterações bioquímicas, assumindo um fenótipo celular mesenquimal que inclui maior capacidade migratória, invasividade, elevada resistência à apoptose e aumento da produção de componentes da matriz extracelular (KALLURI; WEINBERG, 2009; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

Normalmente, este processo está envolvido com o reparo tecidual e com a embriogênese. Mas no câncer, a indução de um fenótipo mesenquimal em células tumorais causa a perda da aderência e alterações na polaridade da célula, e também desenvolve características relacionadas a células tronco do câncer, como a habilidade para iniciar e disseminar o tumor (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014).

A TEM pode ocorrer por diferentes fatores, tais como a dissolução das junções aderentes pela perda funcional de E-caderina, modificação da matriz

extracelular mediada por moléculas da superfamília das integrinas e a ação das metaloproteinases da matriz (MMPs) que degradam os componentes proteicos da matriz extracelular e conseqüentemente, levam a um “afrouxamento” do tecido, e desta forma, permitem a passagem das células metastáticas (RADISKY; RADISKY, 2010).

Em tecidos normais as MMPs possuem sua atividade cuidadosamente controlada pelos mecanismos transcricionais e pós traducionais (CUI; HU; KHALIL, 2017). Mas, em ambientes tumorais, há alterações no controle desta atividade que aumenta a degradação dos componentes da membrana basal e a invasão das células cancerosas (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2011). Isso permite que as células tumorais tenham acesso ao estroma e assim, acessem diretamente a circulação sistêmica e, disseminem-se para sítios distantes por intravasão na luz dos vasos sanguíneos. Na corrente sanguínea essas células são denominadas de células tumorais circulantes (CTCs) (NABESHIMA et al., 2002; ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2013).

Além das CTCs, vesículas extracelulares (VE) e fragmentos de ácidos nucleicos circulantes (cfDNA, do inglês *cell free deoxyribonucleic acid*) podem também ter acesso a corrente sanguínea e a outros fluidos biológicos. Estas moléculas quando liberadas por células cancerosas, no microambiente tumoral, podem regular a atividade das células que estão adjacentes, uma vez que atuam na comunicação celular (ALIX-PANABIÈRES; SCHWARZENBACH; PANTEL, 2012; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

A comunicação celular se refere a troca de sinais entre células e é, geralmente, atribuída a moléculas específicas e a seus receptores. Os principais tipos de comunicação celular são dependentes de contato célula a célula e a transferência de moléculas solúveis. Neste último caso, a comunicação pode ser classificada como autócrina, parácrina e endócrina (ALBERTS et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que VE e cfDNA podem participar também do processo de comunicação celular, uma vez que as vesículas transportam materiais biológicos com microRNAs, DNA, proteínas e lipídios. Quando essas moléculas, liberadas por células cancerosas, são entregues a células receptoras podem modificar processos biológicos e induzir diferentes alterações no microambiente celular a ponto de promover uma cascata de eventos,

que levam células normais a sofrerem modificações que as assemelham a células cancerígenas, doadoras das VE (MITTRA et al., 2015). Desta forma, provavelmente atuam na transformação maligna das células e até mesmo como fator chave para o processo metastático (GARCIA-OLMO; GARCIA-OLMO, 2012; KAHLERT; KALLURI, 2013).

VE e cfDNA podem ser encontrados livres na circulação sanguínea ou em fluidos biológicos, podendo ser utilizados para investigação de diferentes doenças (HEITZER et al., 2017). Diante disso, surgiu a biópsia líquida uma técnica pouco invasiva para detecção de biomarcadores do câncer, encontrados em fluidos biológicos.

1.3. Biópsia Líquida

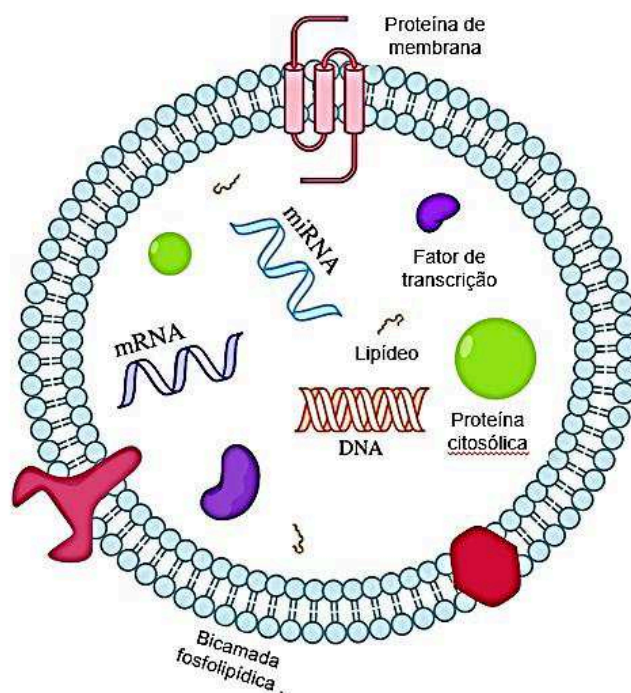
Atualmente, a biópsia líquida é referida como a análise de um tecido biológico não sólido de células tumorais circulantes, VE e cfDNA a partir de fluidos biológicos como sangue periférico. Quando liberadas por células tumorais, VE podem conter proteínas e ácidos nucleicos tumor-específicos, e da mesma forma, cfDNA quando derivado de células tumorais pode conter características próprias dessas células, como mutações ou marcas epigenéticas (CORCORAN; CHABNER, 2019). Essas particularidades das VE e cfDNA podem servir como potenciais marcadores do câncer e podem ser empregadas para o diagnóstico, prognóstico e caracterização de pacientes com esta doença. *In situ*, podem ser utilizados, pelas células cancerígenas, na comunicação celular (HEITZER et al., 2017; PERAKIS; SPEICHER, 2017).

1.3.1. Vesículas Extracelulares

Estas estruturas podem ser liberadas por diferentes tipos celulares no microambiente extracelular. Tais vesículas possuem uma estrutura esférica delimitada por uma bicamada lipídica, semelhante as membranas celulares. Em seu interior há vários tipos de moléculas como proteínas e lipídios, além de DNA,

mRNA, miRNA e metabólitos que reproduzem a condição e o tipo celular de origem (Figura 1) (AKERS et al., 2013; KIM et al., 2015; YOON; KIM; GHO, 2014).

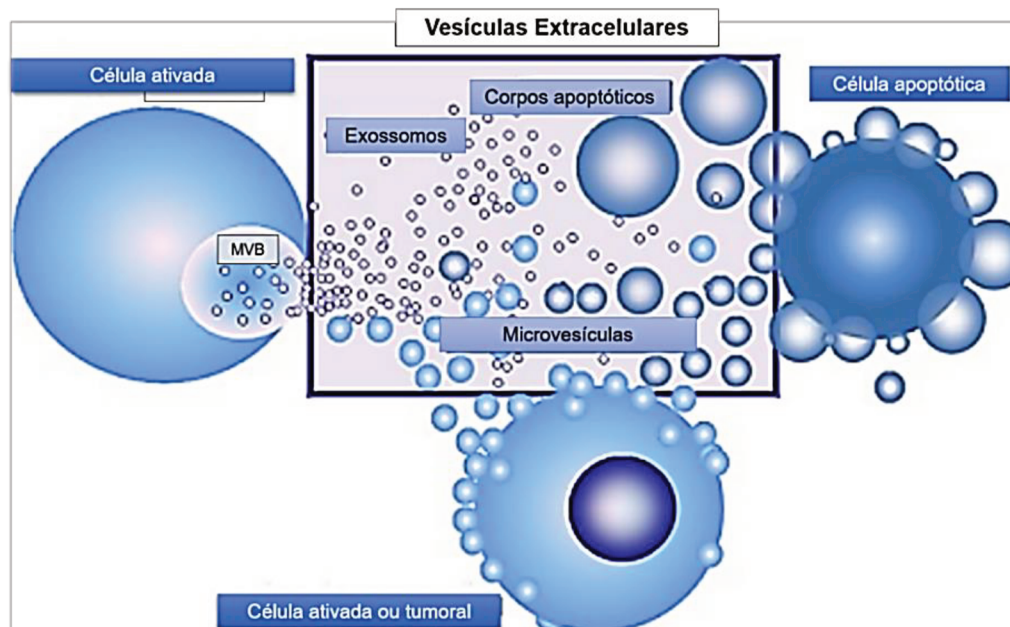
Figura 1. Estrutura e carga das VE. A estrutura das VE se assemelha a estrutura celular, com uma bicamada lipídica e proteínas de membrana. Internamente as VE podem conter diferentes moléculas como: proteínas, mRNA, miRNA, lipídeos e fragmentos de DNA.



FONTE: Adaptado de COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, (2014).

VE podem ser classificadas como: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, dependendo do processo de formação e secreção pela célula (Figura 2) (BEACH et al., 2014). Os exossomos e microvesículas são diferenciados com relação a sua biogênese e possuem um tamanho que varia entre 30-1000 nm. Já os corpos apoptóticos são maiores que 1µm e menos estruturados (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015, NAITO et al., 2017;).

Figura 2. Diferentes tipos de VE liberadas pelas células. As células podem liberar diferentes tipos de vesículas como corpos apoptóticos, exossomos e microvesículas. Estas vesículas são diferenciadas pelo respectivo processo de biogênese e participam de processo da comunicação celular, MVB: corpos multivesiculares.



FONTE: Adaptado de GYÖRGY et al.(GYÖRGY et al., 2011).

A biogênese dos exossomos acontece no interior da célula pela via endocítica. Nesse processo ocorre uma invaginação da membrana celular durante a internalização de ligantes ou componentes celulares. Os endossomos precoces originados contém em seu interior vesículas intraluminais (ILV) e neste caso são denominados como corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular bodies*) (RAPOSO; STORVOGEL, 2013; HESSVIK; LLORENTE, 2018).

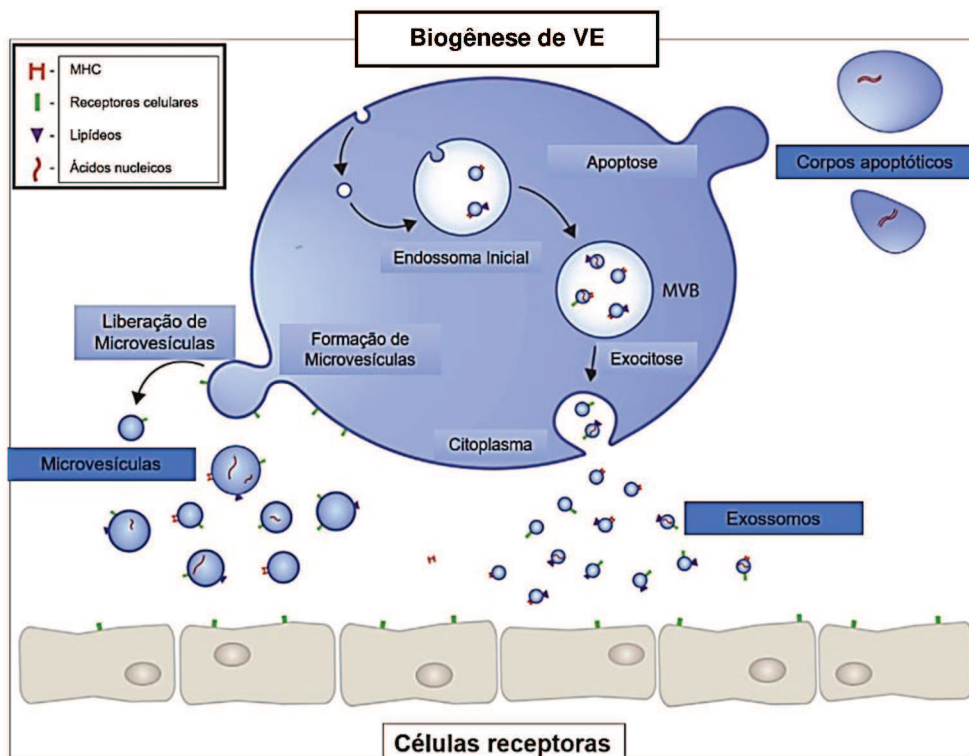
Os MVB podem seguir dois caminhos distintos na célula: fundir-se com os lisossomos e serem degradados, ou fundir-se com a membrana celular e liberar ILV no meio extracelular por exocitose, sendo portanto, a partir de agora, denominados como exossomos (RAPOSO; STORVOGEL, 2013; KASTLOWITZ; YIN, 2014).

Os exossomos liberados possuem em sua composição altos níveis de lipídeos como: aminofosfolipídios, ceramida, esfingolipídeos e colesterol (LÄSSER; ELDH; LÖTVALL, 2012), além de proteínas como: tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81), chaperonas (HSP70), membros da família Rab GTPase (OSTROWSKI et

al., 2010), flotilinas, proteínas *heat shock* e proteínas de síntese de MVB (Alix e TSG101) (COLOMBO et al., 2013).

Já a biogênese de microvesículas acontece por brotamento ou fissão da membrana plasmática, sendo liberadas no ambiente extracelular (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Nas microvesículas, diferente dos exossomos, observa-se elevados níveis de fosfatidilserinas no lado externo da membrana, sendo isto relacionado, portanto, com mecanismos de sinalização (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010). Os corpos apoptóticos são vesículas geralmente liberadas durante a morte celular programada (apoptose) e possuem um tamanho entre 1 – 5 μm (AKERS et al., 2013). Os processos de formação das principais vesículas descritas estão ilustrados na figura 3.

Figura 3. Biogênese de VE pelas células. Por apoptose as células podem liberar os corpos apoptóticos e por exocitose liberar os exossomos envolvendo diferentes proteínas, e por brotamento da membrana liberar microvesículas. Cada uma dessas estruturas pode conter diferentes cargas que vão ser levadas até a célula receptora.



FONTE: Adaptado de GUSTAFSON; VEITCH; FISH, (2017).

Como algumas características entre exossomos e microvesículas podem se sobrepor, ambos serão aqui referidos como VE, de acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) (THÉRY et al., 2018).

Estudos com VE iniciaram a partir dos trabalhos realizado pelo grupo de Harding (1983) e pelo grupo de Pan (1985). Eles verificaram pela primeira vez por microscopia eletrônica de transmissão (MET), que existiam nos reticulócitos maduros pequenas vesículas de tamanho entre 30 - 150 nm dentro do seu citoplasma e que estas vesículas poderiam fusionar-se com a membrana plasmática e liberar seu conteúdo interno no ambiente extracelular. (HARDING; HEUSER; STAHL, 1983; PAN; BLOSTEIN; JOHNSTONE, 1983).

Mais tarde em 1987, Johnstone e colaboradores foram os primeiros a proporem o termo exossomo para descreverem as vesículas formadas por formação de vesículas de endossomos intracelulares e liberação por exocitose (JOHNSTONE et al., 1987).

Ao relacionar as VE com a biologia tumoral, têm sido consideradas essenciais nos processos oncogênicos, associadas a disseminação de células tumorais e a diferentes etapas da cascata metastática, podendo induzir além do crescimento tumoral, quimiorresistência, evasão imune, angiogênese e degradação da matriz extracelular (RATAJCZAK et al., 2006, BECKER et al., 2016; XU et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que em pacientes com câncer as VE secretadas pelas células tumorais não são totalmente capturadas *in situ* por células circundantes, uma vez que podem passar por meio do endotélio e ganhar acesso a circulação sanguínea e a outros fluidos biológicos, como saliva (MACHIDA et al., 2016), leite materno, urina (FOSTER et al., 2016) e fluidos cefalorraquidianos (HANNAFON; DING, 2013).

Evidências recentes afirmam que pacientes com câncer apresentam elevados níveis de microvesículas circulantes quando comparados com pacientes saudáveis, corroborando com os estudos de Poste e Nicolson em 1980, que demonstraram um aumento significativo de VE em fluídos biológicos de pacientes oncológicos e em diversas culturas celulares tumorais (POSTE; NICOLSON, 1980). Além disso, existe uma variação no gradiente de VE de acordo com a progressão da doença. Desta forma, possuem uma importante função na sinalização da

progressão tumoral, podendo agir também como potenciais biomarcadores no câncer (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

1.3.2. *Cell Free DNA* no câncer

A estrutura e a função do DNA foram elucidadas cerca de 65 anos atrás, em meados do século XX. Com a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953, essa molécula tornou-se o centro para compreensão de vários eventos biológicos e auxiliou no avanço de várias áreas na pesquisa científica. Watson e Crick mostraram que a estrutura do DNA é uma dupla hélice constituída por duas cadeias de nucleotídeos unidas pelo pareamento complementar de A (adenina) com T (timina) e de C (citosina) com G (guanina) (WATSON; CRICK, 1953). -

A simplicidade da estrutura do DNA provocou muitos questionamentos para os cientistas daquela época sobre como uma molécula tão simples poderiam conter a informação biológica, transmiti-la de geração a geração fielmente a cada célula e gerar tanta diversidade de organismos. Esta simplicidade do DNA contribuiu para o estudo e para a manipulação desta molécula.

Antes que sua estrutura fosse descrita por Watson e Crick em 1953, os pesquisadores Mandel e Metais no ano de 1948 verificaram a presença de DNA extracelular circulante no plasma de indivíduos (MANDEL & METAIS, 1948). Mais tarde em 1965, Bendich e colaboradores defenderam a ideia de que este cfDNA poderia participar do processo de metástase (BENDICH; WILCZOK; BORENFREUND, 1965) Em 1977, Leon e colaboradores mostraram que os níveis de cfDNA eram significativamente maiores em pacientes com câncer comparado aos indivíduos saudáveis, enquanto outros grupos em 1994 verificaram a presença de mutações tumor-específica em cfDNA de pacientes com câncer (LEON et al., 1977; VASIOUKHIN et al., 1994).

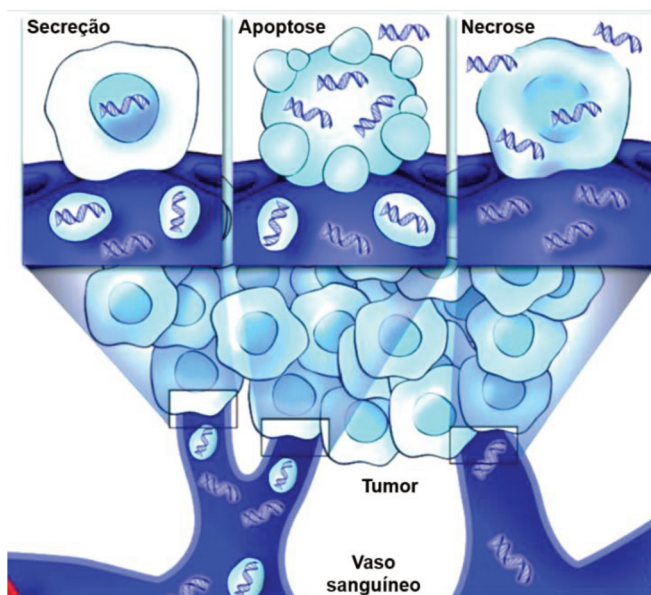
Com esses estudos e com os avanços da biologia molecular avaliando mais a fundo os mecanismos celulares e moleculares, novos papéis do DNA estão sendo elucidados. Com isso, tem sido verificado que o DNA não é apenas responsável pela transmissão de características entre as gerações, mas que pode também atuar

na comunicação celular e conseqüentemente, no desenvolvimento e progressão de doenças como o câncer (BRONKHORST et al., 2016; WANG et al., 2017).

A principal aplicação do cfDNA está no diagnóstico de diferentes neoplasias, uma vez que modificações presentes nesta molécula podem indicar a presença de células cancerígenas (TAKAI et al., 2015). Fluidos biológicos como sangue periférico, fluido cerebrospinal, urina, saliva dentre outros, podem ser empregados em biópsia líquida para detecção e isolamento de cfDNA (SPINDLER et al., 2012; VOLIK et al., 2016).

A fonte de cfDNA na circulação ainda é pouco conhecida. Estudos indicam que eventos celulares como a apoptose, necrose e a secreção celular determinam a quantidade de fragmentos de cfDNA, (Figura 4) (DIAZ; BARDELLI, 2014). Em pacientes com câncer, alterações epigenéticas, mutações, super expressão de determinados genes no cfDNA são algumas das principais investigações feitas para detecção de biomarcadores neste tipo de biópsia líquida (GORMALLY et al., 2007; THIERRY et al., 2014).

Figura 4. Fonte de cfDNA circulante: Células tumorais podem liberar pequenas fragmentos de cfDNA na circulação por apoptose, necrose e secreção celular.



FONTE: Adaptado de DIAZ; BARDELLI, (2014).

Além da aplicação como potencial biomarcador, investigações com voluntários saudáveis e neoplásicos estão sendo realizadas na tentativa de

compreender o papel do cfDNA em eventos biológicos, como demonstrado por Zinkova et al. (2017). Em seus estudos verificaram que o cfDNA, proveniente de indivíduos saudáveis apresentou função na regulação da resposta imune (ZINKOVA et al., 2017). Também García-Olmo e colaboradores (2012), em estudos clínicos a partir de pacientes com câncer de cólon, verificaram que há transferência de genes e transformação de células por ácidos nucleicos isolados do plasma. Diante disso, propuseram que o cfDNA no plasma participa da tumorigênese e no desenvolvimento de metástases por transfecção em células suscetíveis, o que chamaram de “genometástase”. (GARCÍA-OLMO et al., 2012)

Em conjunto, esses resultados indicam uma relevante participação do cfDNA e das VE em diferentes eventos biológicos e patologias. Desta forma, faz-se pertinente compreender como essas moléculas e seus componentes atuam em células normais da próstata, e se estas liberam sob estímulo com o cfDNA algum metabólito capaz de identificar alterações malignas iniciais, ou com capacidade de distinguir indivíduos saudáveis de indivíduos com CaP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a ação de vesículas extracelulares e cfDNA provenientes de pacientes com câncer de próstata em linhagens celulares normais da próstata (RWPE-1 e PNT-2).

2.2. Objetivos específicos

- Isolar vesículas extracelulares a partir do plasma sanguíneo de pacientes saudáveis e com CaP, bem como do sobrenadante da cultura primária de biópsias de pacientes com CaP e de pacientes com hiperplasia benigna prostática;
- Analisar a distribuição das vesículas extracelulares purificadas em relação ao tamanho;
- Avaliar o papel das vesículas extracelulares na migração, proliferação celular e expressão gênica nas linhagens celulares normais da próstata (RWPE-1 e PNT-2);
- Isolar cfDNA a partir do plasma sanguíneo de pacientes com câncer de próstata e de indivíduos saudáveis;
- Analisar a concentração de cfDNA entre os pacientes com câncer de próstata e os indivíduos saudáveis e, a possibilidade de distinguir pacientes neoplásicos de indivíduos saudáveis a partir da concentração de cfDNA;
- Avaliar a ação dos cfDNA de pacientes com câncer de próstata e saudáveis nas linhagens celulares normais da próstata (RWPE-1 e PNT-2) em relação a alteração da expressão gênica;
- Analisar a metabolômica do sobrenadante das linhagens celulares normais da próstata (RWPE-1 e PNT-2) tratadas com cfDNA de pacientes com câncer de próstata e de indivíduos saudáveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises com VE

3.1.1. Coleta da amostra biológica

Para as análises das VE foram coletadas amostras de sangue e tecido de pacientes com CaP e de indivíduos controles. Os fragmentos das biópsias teciduais foram obtidos com o consentimento informado de cinco pacientes com HPB, e 10 pacientes com CaP, histologicamente verificados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Já as amostras de sangue foram obtidas de 20 pacientes com CaP e de 20 indivíduos saudáveis. Todas as amostras foram coletadas com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número parecer 562.678 e assinatura dos pacientes. Nenhum dos pacientes com CaP tinham recebido terapia antitumoral pré-operatória (Tabela 1).

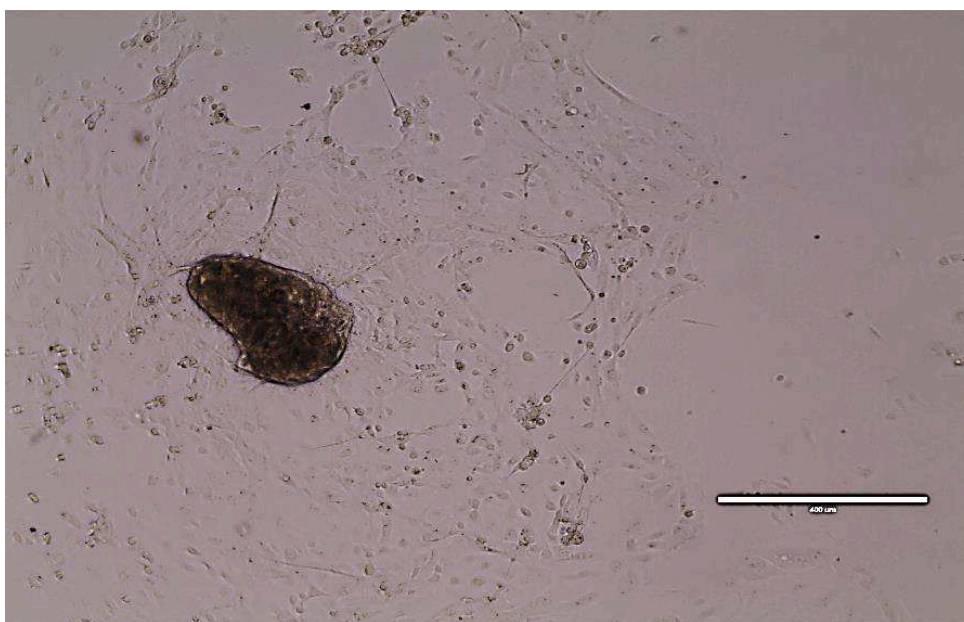
Tabela 1: Parâmetros clínicos dos pacientes para as análises de VE.

Características	Controles (N=20)	HBP (N=5)	Pacientes CaP (N=30)
Idade (média)	18,0 (28-44)	62 (50-70)	72,26 (55-92)
Gleason Score – N (%):			
6 (3+3)	---	---	14 (46,66)
7 (3+4)	---	---	04 (13,33)
7 (4+3)	---	---	05 (16,66)
8 (4+4)	---	---	03 (26,66)
9 (4+5 e 5+4)	---	---	04 (13,33)
Estadiamento dos Pacientes com CaP (%):			
T1	---	---	02 (6,66)
T2a	---	---	05 (16,66)
T2b	---	---	06 (20,00)
T3a	---	---	08 (26,66)
T4	---	---	09 (30,00)

3.1.2. Cultura primária das biópsias

As biópsias de tecido foram fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um bisturi e lavadas duas vezes com PBS (0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0018 M KH₂PO₄) em condições estéreis e transferidas para a garrafa de cultura de células (25 cm²) com 1 mL de soro fetal bovino (SFB) livre de VE. Depois de 24 h de cultura, SFB foi removido e 5 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB foram adicionados na cultura primária. Posteriormente a estabilização da cultura (50% de confluência), figura 5, o meio condicionado foi coletado a cada 48 h durante 10 dias.

Figura 5. Cultura primária de biópsias prostáticas. Estabelecimento da cultura de células da próstata de pacientes diagnosticados com CaP após 15 dias de cultivo com meio RPMI suplementado com 10% de SFB (aumento 10X).



3.1.3. Isolamento das VE do meio condicionado

O meio condicionado coletado da cultura primária foi centrifugado a 300 x g por 5 min e, em seguida centrifugado novamente a 10.000 x g por 30 min para eliminar *debris* celulares. A fração de VE foi obtida a partir da ultracentrifugação por 2 h a 100.000 x g e lavada duas vezes com 10 mL de PBS. Posteriormente, as VE

foram ressuspensas em 100 µl de PBS. As VE, isoladas a partir da cultura primária das biópsias de pacientes com CaP, foram denominadas neste trabalho como bVE e aquelas dos pacientes com HPB foram denominadas como hVE.

3.1.4. Isolamento das VE do plasma

Foi coletado sangue de 20 pacientes com CaP e de 20 indivíduos saudáveis em tubos de EDTA. Todas as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 min para separar o plasma. Em seguida o plasma foi transferido para um tubo *falcon* de 50 mL e novamente centrifugado por 20 min a 2.000 x g em temperatura ambiente para remover *debris* celulares. O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para um novo tubo e diluído em um volume de PBS cinco vezes maior ao volume obtido do plasma, que foi filtrado em filtro de 0,22 µm (Merck Millipore) para remover contaminantes. O filtrado foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 1 h. O pellet obtido foi lavado com 10 mL de PBS e ultracentrifugado novamente a 100.000 x g por 1 h e o *pellet* final foi ressuspensado em 100 µl de PBS. As VE isoladas do plasma de pacientes com CaP são referidas, neste trabalho, como pVE e as VE de indivíduos saudáveis com pnVE.

3.1.5. Lise das VE e quantificação do conteúdo proteico

Após o isolamento das VE foi realizada sua lise para a quantificação das proteínas vesiculares com o *Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent* (Thermo Fisher Scientific). Ao *pellet* de VE foi adicionado 500 µl do tampão CER 1 gelado com inibidor de protease (1:100) para romper a membrana celular e liberar o conteúdo proteico. Em seguida a mistura foi vortexada por 15 seg, incubada no gelo por 10 min e adicionado a esta 27,5 µl do tampão CER II. Novamente a mistura foi vortexada, incubada no gelo por 1 min e centrifugada por 5 min - 16.000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante (extrato proteico) foi transferido para um novo tubo, previamente gelado e armazenado a -80°C até a quantificação proteica.

A quantificação das proteínas foi feita para estimar indiretamente a quantificação de VE. Desta forma, foi utilizado o método do ácido Bicinconínico (*BCA protein assay kit -Thermo Fisher Scientific*) conforme recomendações do fabricante. O método consiste em duas etapas, uma primeira etapa na qual as proteínas reduzem o Cu^{2+} para Cu^{1+} em condições alcalinas, já na segunda etapa moléculas de BCA, reagente cromogênico específico para Cu^{1+} , reagem com esse metabólito formando uma solução púrpura com absorvância de 562 nm. A absorvância é diretamente proporcional a quantidade de proteínas presentes nas amostras e pode ser estimada por comparação com uma curva padrão de concentração conhecida de proteínas, feita com BSA (albumina sérica bovina). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 563 nm.

Para os ensaios foram utilizados *pools* de cada grupo de VE (bVE, hVE, pVE e pnVE). Os *pools* foram feitos com 20 μL das VE isoladas dos pacientes correspondentes de cada grupo. Para o tratamento das células 10 μL (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dessa mistura foram utilizados nos ensaios.

3.1.6. Análise morfológica e tamanho das VE por MEV

A morfologia e o tamanho das VE foram caracterizados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para este procedimento as VE purificadas foram ressuspendidas em PBS e fixadas em glutaraldeído 1% em PBS. Depois de 15 min de incubação as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, seguida por uma desidratação progressiva com diferentes concentrações de etanol (40%, 60%, 80% e 100%). As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 48 h para uma completa desidratação. Em seguida, as amostras foram metalizadas com nanopartículas de ouro e analisadas por MEV (SOKOLOVA et al., 2011).

3.1.7. Marcação das VE

Os quatro *pools* de VE (30 μl) foram incubados individualmente com 5 μl de *Alexa 555* (Thermo Fisher Scientific) por 30 min a temperatura ambiente. Em

seguida a mistura foi diluída em 10 mL de PBS e ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 h para formar o *pellet* das VE que foram marcadas com *Alexa fluor 555*. Posteriormente, após duas lavagens com PBS as VE foram ressuspensas em 100 µl de PBS.

3.1.8. Cultura de linhagens celulares

As linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 foram cultivadas em meio Queratinócito, suplementado com extrato de pituitária (0,05 mg/mL) e fator de crescimento epidermal (EGF) (5 ng/mL), e meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, respectivamente. Além desses suplementos também foram adicionados aos meios 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Ambas as linhagens foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂ até atingirem 90% de confluência, quando as células foram tripsinizadas e plaqueadas para posteriores ensaios. Durante o cultivo os meios foram trocados a cada três dias.

3.1.9. Avaliação da internalização das VE pelas células da próstata

Para a avaliação da internalização as linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 foram cultivadas em placas de 24 poços com uma densidade de 1x10⁵ células por poço, sendo que cada continha uma lamínula circular de 13 milímetros de diâmetro. A seguir, adicionou-se 10 µl de VE marcadas com *Alexa fluor 555* nas células, que foram então incubadas por 24 h a 37°C. Ao término da incubação as células foram lavadas e fixadas utilizando-se uma solução de acetona e metanol (50% v/v) por 15 min. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e as lâminas foram montadas. A internalização das VE marcadas pelas linhagens celulares foi avaliada em microscópio de fluorescência (Thermo Fisher Scientific).

3.1.10. Ensaio de migração celular

As linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 foram semeadas na densidade de 1×10^5 células por poço e cultivadas em placas de 24 poços até 80% de confluência. Após atingir a confluência desejada foi realizado um *scratched* na monocamada de células com uma ponteira (p200) estéril e, posteriormente as células foram lavadas duas vezes para retirar células suspensas. Em seguida, foi adicionado 500 μ l de meio livre de soro e 25 μ g de cada VE por poço. A migração celular foi monitorada por microscopia e as imagens foram fotografadas nos tempos de 0 h e 24 h. A quantificação das células que migraram foi feita usando o *software* Image J. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.11. Ensaio de proliferação celular

As linhagens RWPE-1 e PNT-2 foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^3 células/poço), tratadas com 25 μ g VE ou PBS e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram adicionados 10 μ l do reagente *CytoSelect Cell Proliferation* kit (Cell Biolabs) e as células incubadas por mais 4 h. O experimento foi feito em triplicata e a leitura da fluorescência feita em Luminômetro (Perkin Elmer), utilizando comprimentos de onda de 560 nm de excitação e 590- 600 nm de emissão.

3.1.12. Extração de RNA

O RNA total para as análises em qPCR foi extraído das linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 tratadas com 25 μ g VE ou PBS por 24 h e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. A extração foi realizada com reagente Trizol conforme as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

3.1.13. qPCR

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando o Kit M-MLV Reverse Transcriptase de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). A reação de transcriptase reversa foi realizada a 37°C por 60 min usando o equipamento *Mycycler thermal cycler* (Thermo Fisher Scientific). As reações de PCR quantitativa foram realizadas usando *taqman array plates* conforme as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific) e aparelho *7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)* para avaliar a expressão de 50 genes relacionados ao CaP (tabela 2). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Os genes endógenos utilizados neste ensaio foram o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), o B2M (beta-2-microglobulina), o HPRT1 (Hipoxantina fosforibosil transferase 1) e o GUSB (Beta-glucoronidase). O *threshold fluorescence* foi manualmente configurado para todas as placas usando SDS software (Applied Biosystems). As análises foram realizadas a partir do *Cycle threshold (Ct)* usando *DataAssist™ v3.01 Software* (Applied Biosystems).

Tabela 2: Genes avaliados por qPCR.

Sigla	Descrição
PCA3	Prostate cancer antigen 3 (non-protein coding)
KLK3	Kallikrein-related peptidase 3
FOLH1	Folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1
AR	Androgen receptor
SRD5A2	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2)
KLK2	Kallikrein-related peptidase 2
ANXA1	Annexin A1
LSP1	Lymphocyte-specific protein 1
RNASEL	Ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)
EEF1A2	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2

TLR9	Toll-like receptor 9
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
TP53	Tumor protein p53
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
GHR	Growth hormone receptor
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
PBOV1	prostate and breast cancer overexpressed 1
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11
ADAR	Adenosine deaminase, RNA-specific
PCAT6	Prostate cancer associated transcript 6 (non-protein coding)
ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TNF	Tumor necrosis factor
NKX3-1	NK3 homeobox 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
IL-6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
TGFB1	TGFB-induced factor homeobox 1
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) recepto
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MDM2	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
APOE	Apolipoprotein E
SOX9	SRY (sex determining region Y) – box 9
CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
CD133	CD133 molecule
KRT8	Keratin 8
PRUNE2	Prune homolog 2
PRAC	prostate cancer susceptibility candidate
CD44	CD44 molecule

RBM39	RNA binding motif protein 39
SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6
CDKN2B-AS1	CDKN2B antisense RNA 1
ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1 family
ELAC2	elaC ribonuclease Z 2
c-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
KRT18	Keratin 18
NCAD	neural cadherin
VIM	Vimentin
ECAD	E-cadherin

3.2. Análises com cfDNA

3.2.1. Coleta das amostras biológicas para análise de cfDNA

A amostra biológica (sangue) foi obtida com o consentimento informado de 36 indivíduos, sendo deste total 22 pacientes com carcinoma de próstata histologicamente verificados no Hospital das Clínicas da UFU e 14 voluntários saudáveis. Todas as amostras foram coletadas mediante aprovação do CEP sob o número parecer 562.678 e assinatura do consentimento dos pacientes e voluntários. O número de pacientes com CaP foi dividido em dois grupos, aqueles que foram diagnosticados em estadiamento T1/T2 (n = 15) e aqueles diagnosticados em T3/T4 (n = 7), conforme tabela 3. Nenhum dos pacientes do grupo T1/T2 tinha recebido terapia antitumoral pré-operatória, já o grupo T3/T4, compostos por pacientes em fase metastática, tinha recebido terapias de bloqueio hormonal e radioterapia.

Tabela 3: Parâmetros clínicos dos pacientes para as análises do cfDNA.

Características	Controles (N=14)	Pacientes CaP (N=22)
Idade (média)	18,0 (28-44)	61,26 (52-75)
Gleason Score – N (%):		
6 (3+3)	---	06 (27,27)
7 (3+4 e (4 + 3)	---	07 (31,81)
8 (4+4)	---	05 (22,72)
9 (4+5 e 5+4)	---	04 (18,18)
Estadiamento dos Pacientes com CaP (%):		
T1c	---	05 (22,72)
T2a	---	10 (45,45)
T3b	---	03 (13,63)
T4	---	04 (18,18)
Tratamento (T3/T4)		Radioterapia e Bloqueio hormonal

3.2.2. Isolamento de cfDNA do plasma

O sangue dos 36 indivíduos foi coletado em tubos de EDTA. Posteriormente, esses tubos foram centrifugados a 4.000 x g por 10 min para separação do plasma. Em seguida, o plasma foi transferido para um microtubo de 2 mL e novamente centrifugado por 10 min a 2.000 x g a temperatura ambiente para remover *debris* celulares. O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para um novo tubo.

O isolamento do cfDNA foi realizado com o *kit XCF complete exosome & cfDNA isolation* (SBI System Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante. A partir do plasma centrifugado foram retirados 500 µl e esses foram misturados com 12 µl do reagente A, a mistura foi vortexada por 10 seg e incubada por 55°C por 10 min. Em seguida 128 µl do reagente *ExoQuick* foi combinado a essa mistura, vigorosamente vortexada, e incubada por 30 min a 4°C. Após a incubação a mistura foi centrifugada a 13.00 x g por 10 min e ao sobrenadante foi

adicionado 1 mL de tampão de ligação. Esta nova mistura foi transferida para uma coluna com um tubo coletor e centrifugada por 3.300 x g por 2 min. A coluna foi lavada 2 vezes com tampão de lavagem e por fim, feito a eluição com o respectivo tampão de eluição presente no Kit.

3.2.3. Análise do tamanho dos fragmentos de cfDNA

O tamanho do cfDNA de cada *pool* foi analisado por eletroforese capilar (CE). Isso foi feito utilizando um microchip do *Kit High Sensitivity DNA* em um *Bioanalyser Agilent 2100* (Agilent Technologies), pelo laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD-UNICAMP). Depois que os ácidos nucléicos são separados para CE, eles são normalizados para uma escala entre dois marcadores de DNA, e são representados como uma banda virtual. O software calcula automaticamente o tamanho de cada banda e é representado como um eletroferograma.

3.2.4. Quantificação do cfDNA

A amplificação do cfDNA foi realizada por *qPCR* para quantificar o cfDNA das amostras coletadas. Foi utilizado o primer LINE: *forward* 5'-GGATTAA GAAAATGTGGCACCATATACACCATGG-3'; *reverse* 5'-ATAGTTTACTGAGAAT GATG GTTTCCAATTTC-3', sintetizado pela *Integrated DNA Technologies* (IDT). As condições da PCR foram 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C, 1 min de anelamento a 60°C. A concentração absoluta do gene alvo foi calculada usando uma curva padrão. Para este estudo a curva padrão foi gerada usando 5 diluições seriadas de DNA genômico comercial (5000; 500; 50; 5 e 0,5 pg/ µl). Cada replica biológica foi quantificada em duplicata, e a curva padrão em triplicata para cada corrida.

3.2.5. Cultura de linhagens celulares

As linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 foram cultivadas seguindo as mesmas condições citadas no item 3.1.8.

3.2.6. Preparo dos *pools* de cfDNA

Para avaliar o papel do cfDNA isolado dos diferentes grupos de indivíduos, cujo o sangue foi coletado, 3 *pools* de cfDNA foram preparados. O primeiro *pool* preparado contém o cfDNA obtido dos 14 indivíduos saudáveis considerados saudáveis (N), já o segundo *pool* contém o cfDNA dos 22 pacientes com CaP estadiado em T1 e T2 (T1/T2), e o último *pool* preparado contém o cfDNA dos 7 pacientes com CaP estadiado em T3 e T4 (T3/T4). Foram utilizados aproximadamente 10 ng do cfDNA de cada paciente para preparo dos *pools*.

3.2.7. Tratamento das linhagens celulares com cfDNA

As linhagens RWPE-1 e PNT-2 foram semeadas em placas de 6 poços (2 x 10³ células/poço), tratadas com 20 ng de cada *pool* de cfDNA (N, T1/T2, T3/T4) e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Células sem tratamento também foram avaliadas e consideradas como controles dos experimentos. O ensaio foi conduzido em triplicata.

Após o período de tratamento com cfDNA, 100 µl do sobrenadante de cada treplica, de ambas as linhagens celulares, foram coletados para as análises de metabólitos e as células foram tripsinizadas para extração de RNA total.

3.2.8. Extração de RNA total

O RNA total para as análises em qPCR foi extraído das linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 tratadas com os *pools* de cfDNA (N, T1/T2 e T3/T4) por 24h. A

extração foi realizada com reagente Trizol conforme as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

3.2.9. qPCR

o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando o *Kit M-MLV Reverse Transcriptase* de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). A reação de transcriptase reversa foi realizada a 37°C por 60 min usando o equipamento *Mycycler thermal cycler* (Thermo Fisher Scientific). As reações de qPCR foram realizadas usando o aparelho *7300 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems) para avaliar a expressão de 7 genes, (vimentina (VIM), E-caderina (ECAD), N-caderina (NCAD), molécula de adesão celular epitelial (EPCAM), metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), glicoproteína da superfície celular (CD44), glicoproteína transmembrana (CD133), relacionados ao CaP e a TEM. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 60 seg. O gene endógeno utilizado neste ensaio foi o B2M (beta-2-microglobulina). O *threshold fluorescence* foi manualmente configurado para todas as placas usando SDS software (Applied Biosystems). As análises foram realizadas a partir do *Cycle threshold (Ct)* usando *DataAssist™ v3.01 Software* (Applied Biosystems).

3.2.10. Metabolômica

A análise metabolômica foi realizada a partir da coleta de 100 µl do sobrenadante das linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 não tratadas (controle) e tratadas por 24 h com os respectivos *pools* de cfDNA: N, T1/T2 e T3/T4.

3.2.10.1. Preparo das amostras para metabolômica

Após a coleta do sobrenadante foi adicionado 1 mL de metanol grau espectroscópico e a mistura incubada por 4 h a -80°C, e em sequência,

centrifugada por 15 min à 13.000 x g. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos para que fosse feita a concentração da amostra em concentrador a vácuo, por 30 min e, subsequentemente, as amostras foram liofilizadas. Para as análises de espectrometria de massa as amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol grau espectroscópico e filtradas em filtro de ponta de seringa com poro de 0,22 µm.

3.2.10.2. Análise IES/EM por infusão direta

As análises de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES/EM por infusão direta foram realizadas com um cromatógrafo líquido (marca *Agilent* modelo *Infinity* 1260) para injeção das amostras, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF da marca *Agilent* modelo 6520 B com fonte de ionização por *electrospray* (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL.min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90 % metanol e 10 % de água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v.v⁻¹)), o volume de injeção das amostras foi de 2 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KVa. Os dados foram adquiridos nos modos positivos e negativos.

3.2.10.3. Análise quimiométrica

Os espectros de massas obtidos por infusão direta foram extraídos no formato TXT e submetidos no programa MATLAB (MATrix LABoratory), versão R2015a, passando por normalização e os picos com abundância menor ou igual a 5% da abundância máxima sendo retirados. Foi realizado a média dos espectros, dando origem à matriz para Análise de Componentes Principais (PCA)) usando o *PLS_Toolbox*, versão 8.7.

Por normalização, entende-se que para cada um dos valores de m/z de todos os espectros foi achado o maior valor de abundância relativa e, esse, igualado a

100%. Então, para os outros valores de abundância relativa daquela m/z em questão, foram atribuídos valores proporcionais em porcentagem.

O corte consiste na retirada de picos, (valores de m/z), onde a abundância, na matriz normalizada, não excedesse o valor de 5%. Esse limite de corte é definido comparando o desempenho da PCA para vários limites testados. Para as análises, a matriz foi dividida em conjuntos como se segue na tabela 4. Esta análise foi conduzida no laboratório de Quimiometria do Triângulo - UFU.

Tabela 4. Divisão da matriz para as análises de quimiometria.

Conjunto	Comparação
A1	PTN-2 C + PTN-2 N
A2	PTN-2 C + PTN-2 T1
A3	PTN-2 C + PTN-2 T3
A4	PTN-2 N + PTN-2 T1
A5	PTN-2 N + PTN-2 T3
A6	PTN-2 T1 + PTN-2 T3
A7	RWPE-1 C + RWPE-1 N
A8	RWPE-1 C + RWPE-1 T1
A9	RWPE-1 + RWPE-1 T3
A10	RWPE-1 N + RWPE-1 T1
A11	RWPE-1 N + RWPE-1 T3
A12	RWPE-1 T1 + RWPE-1 T3

3.2.10.4. EM e EM/EM para identificação dos metabólitos

Espectrômetro de massas de alta resolução QTOF, marca Agilent, modelo 6520 B, com fonte de ionização por *electrospray* foi utilizado para nova injeção das amostras visando à identificação dos compostos mais significantes a partir das análises de quimiometria. Desta forma, as amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas utilizando seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200 µL h⁻¹. A ionização foi realizada com gás nebulizante a 20 psi, o gás secante aquecido a 200 °C com fluxo de 8,0 L min⁻¹ e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos nos modos positivo e negativo. A identificação dos constituintes foi realizada levando em consideração a

massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menores que 10 ppm) e os espectros de massa/massa (EM/EM), sendo estes dados cruzados com banco de dados (METLIN, MASSBANK EUROPEAN, MASSBANK OF NORTH AMERICA, HMDB, DRUGBANK, CFM-ID, METABOLOMICS WORKBENCH, SMPDB, PUBCHEM, METLIN e LIPIDBANK) e a literatura.

3.3. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada usando o *software GraphPad Prism* versão 7,0. Os dados obtidos foram analisados usando análise de variância (ANOVA). Para os ensaios de qPCR, migração e proliferação celular a comparação e análise foi realizada com o auxílio de testes não paramétricos (Kruskal-Wallis test seguido dos pós teste de Dunn's). Já as análises da concentração do cfDNA foram feitas usando *test t student* e pós teste de *Mann Whitney*. Foram considerados como estatisticamente significantes as comparações cujo o valor de *p* foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Também foi feito análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para avaliar a capacidade do cfDNA para o diagnóstico e separação dos estadiamentos do CaP e indivíduos saudáveis.

4. RESULTADOS

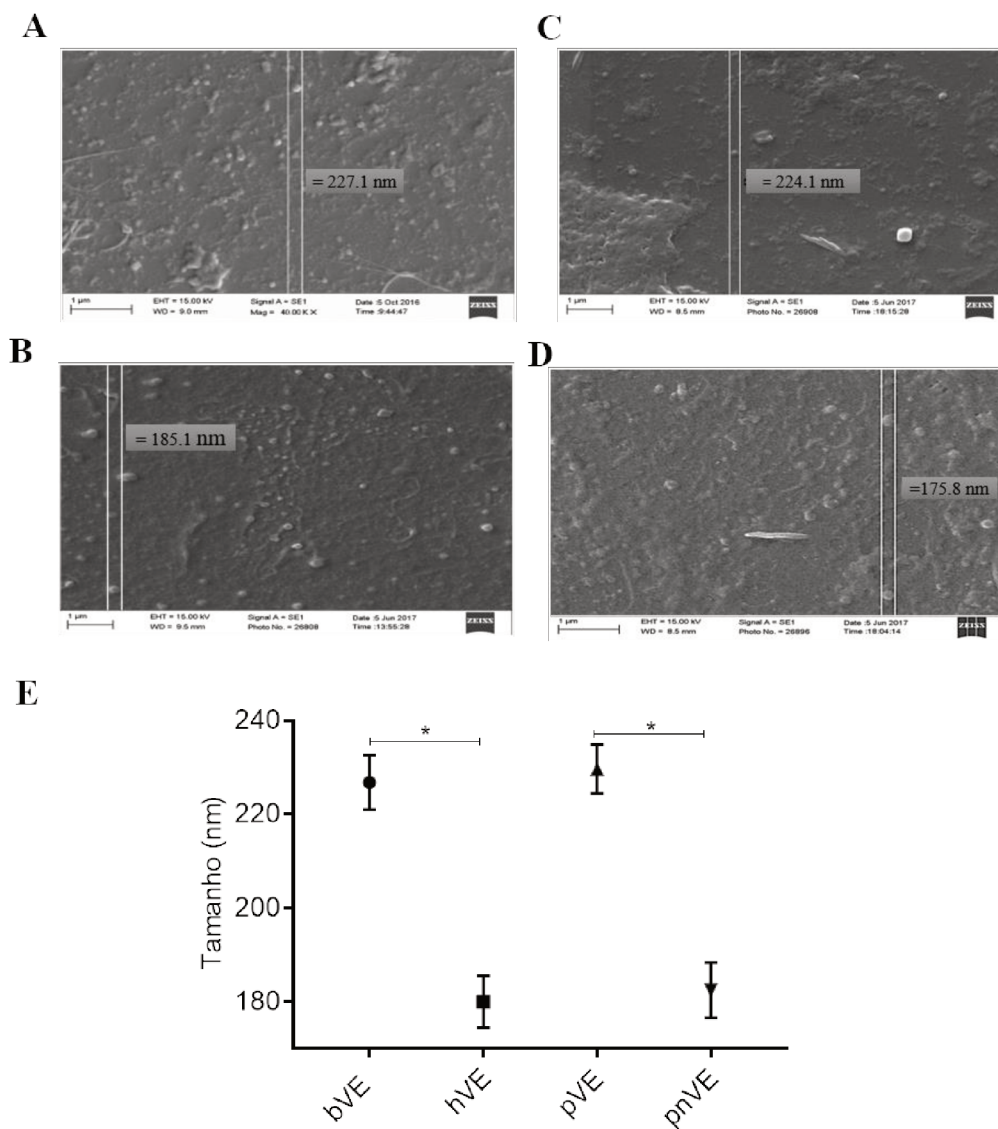
4.1. Análises com VE

4.1.1. Caracterização do tamanho e avaliação da internalização das VE

Os *pools* de bVE e pVE, isolados de pacientes com CaP em diferentes estadiamentos, foram considerados *pools* de VE malignos, enquanto hVE e pnVE foram considerados *pools* de VE controles. A quantidade de proteínas presente em cada *pool* quantificada por BCA foi de cerca de 2,5 µg/µl para os *pools* hVE e pnVE e 2,9 µg/µl para os *pools* bVE e pVE.

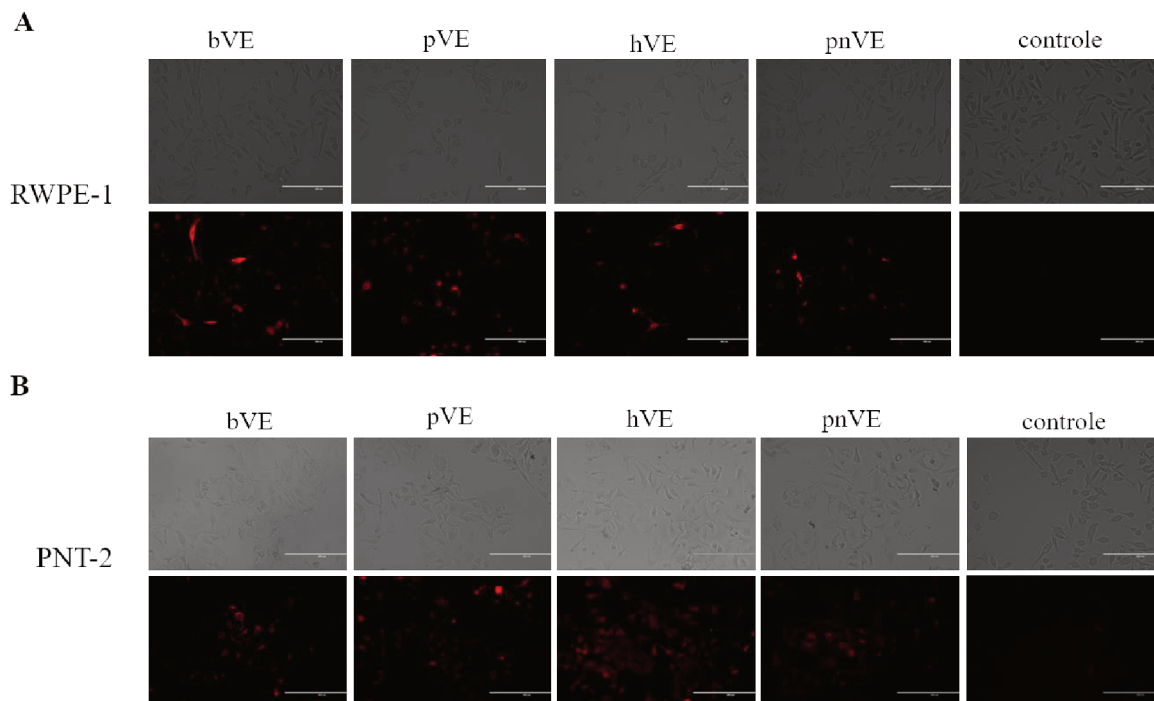
Para comparar o tamanho entre *pools* de VE malignos e normais, vesículas isoladas por ultracentrifugação foram fixadas e observadas por MEV. As VE dos *pools* de bVE e pVE apresentaram tamanhos maiores em comparação com os controles, hVE e pnVE ($p < 0,05$). A média dos tamanhos de bVE e pVE foram 220-230 nm, enquanto a média dos tamanhos de hVE e pnVE foram iguais ou menores que 185 nm (Figura 6).

Figura 6. Caracterização do tamanho dos VE por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **A** - Imagens de MEV representativas de VE derivadas de biópsias de tumores primários (bVE), **B** - hVE, VE de biópsias de hiperplasia benigna da próstata **C**- pVE, VE de plasma de pacientes com CaP e **D** - pnVE, VE de plasma de indivíduos saudáveis. **E** - A análise do tamanho médio das VE isoladas. Os dados são expressos com a média e desvio padrão entre as triplicatas, ($p < 0,05$).



Para verificar se as linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 internalizavam as VE, essas foram marcadas com o corante de membrana *Alexa flour 555*. As imagens capturadas por microscopia apresentaram um padrão característico de fluorescência, indicando as células incorporavam VE em todos os tratamentos, enquanto no controle sem VE não foi observado fluorescência (Figura 7).

Figura 7: Internalização de VE em células normais da próstata. VE exógenas previamente marcadas com *Alexa fluor 555* (vermelho) foram incorporadas após 12 h de tratamento, como demonstrado **A** - Interação das VE com a linhagem RWPE-1, **B** - Interação das VE com a linhagem PNT-2. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência, aumento de 10 x. Barra de escala: 200 μ m.



4.1.2. Análises funcionais das VE

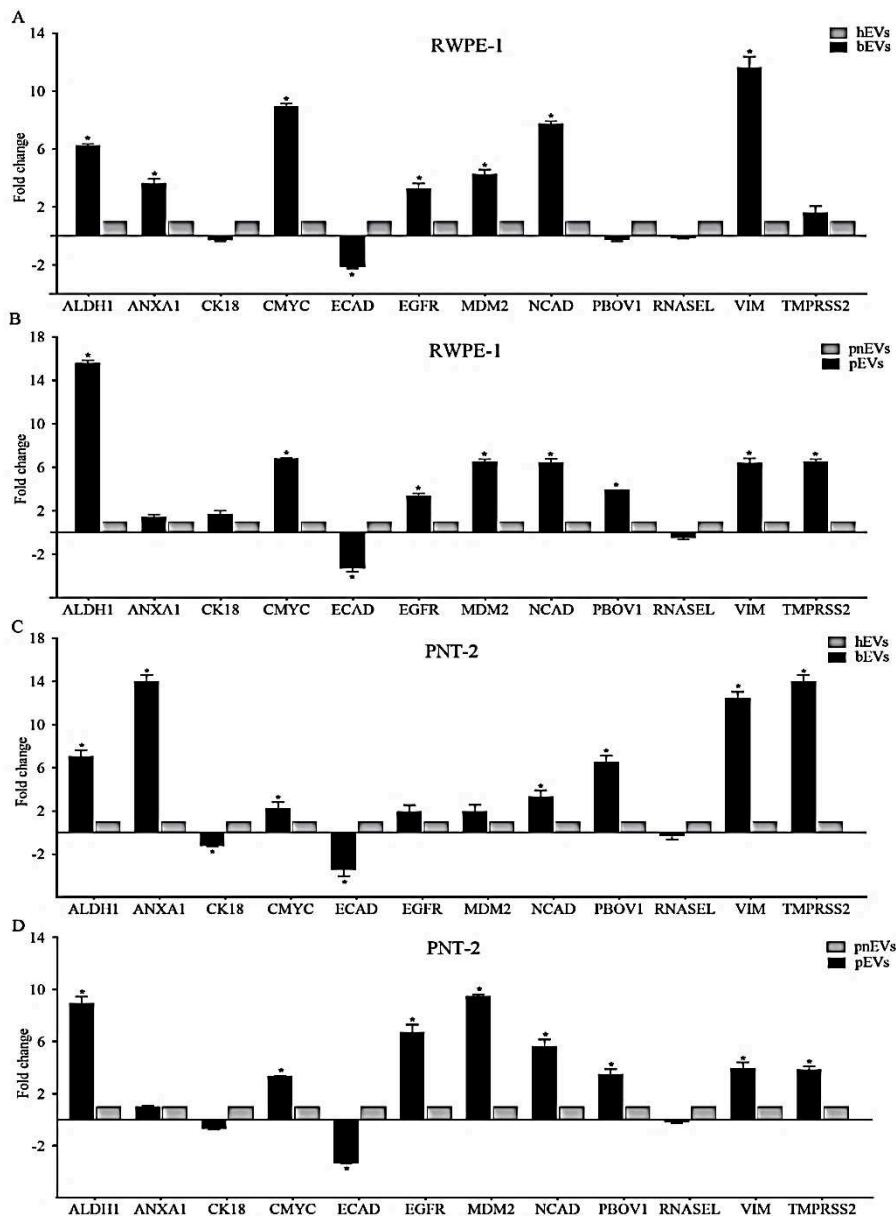
Após a caracterização do tamanho e avaliação da interação célula – VE, foi avaliada a expressão de 50 genes associados ao CaP. Desses, 12 genes mostraram alterações em seus níveis de expressão nas células tratadas com os *pools* de VE isolados de pacientes com CaP (Figura 8).

Na linhagem celular RWPE-1 tratada com bVE os genes ALDH1, ANXA 1, cMYC, EGFR, MDM2, NCAD e VIM apresentaram-se super expressos em relação as células tratadas com o *pool* de hVE controle. Enquanto que o gene ECAD apresentou baixo nível de expressão (figura 8A). Em relação ao tratamento com pVE o aumento da expressão foi observado nos genes ALDH1, cMYC, EGFR, MDM2, NCAD, PBOV1, VIM e TMPRSS2, já o gene ECAD foi também, nesse tratamento, pouco expresso ($p < 0,05$) (figura 8B).

Na linhagem celular PNT-2 tratada com bVE os genes ALDH1, ANXA1, cMYC, NCAD, PBOV1, VIM e TMPRSS2 foram super expressos. E os genes CK18

e ECAD apresentaram baixos níveis de expressão (figura 8C). Quando essas células foram tratadas com pVE observou-se a super expressão dos genes ALDH1, cMYC, EGFR, MDM2, NCAD, PBOV1, VIM e TMPRSS2, enquanto o gene ECAD foi novamente pouco expressão (figura 8D). As análises da qPCR foram feitas tendo como calibradores as células tratadas com hVE e pnVE. A expressão dos demais genes analisados (tabela 2) não foi detectável por qPCR.

Figura 8: Alterações nas assinaturas gênicas associadas ao tumor causadas pelo tratamento dos VE. **A** - Linhagem celular RWPE-1 tratada com bVE, calibrador hVE. **B** - Linhagem celular RWPE-1 tratada com pVE, calibrador pnVE. **C** - Linhagem celular PNT-2 tratada com bVE, hVE calibradores. **D** - Linha celular PNT-2 tratada com pVE, calibrador pnVE. Os dados são expressos como a média e desvio padrão entre as triplicatas ($p < 0,05$).



Mediante as alterações genéticas evidenciadas, verificou-se a possibilidade das VE, oriundas do CaP, alterar o perfil de proliferação e de migração celular.

Os resultados mostraram que a proliferação de RWPE-1 e PNT-2 aumentou significativamente após o tratamento destas células com bVE e pVE, quando comparada ao controle, o que sugere que as VE, derivadas do CaP, estão colaborando com a proliferação das células normais (Figuras 9A e 9B). Curiosamente, o tratamento com pnVE provocou a diminuição da proliferação da linhagem RWPE-1 em relação também ao controle ($p < 0,05$).

Sob as mesmas condições, a migração de ambas as células, RWPE-1 e PNT-2, aumentou aproximadamente 40% e 60% respectivamente, quando tratadas com bVE e pVE (Figuras 10A e 10B).

Figura 9 Avaliação da influência do tratamento de VE na proliferação. As linhagens celulares RWPE-1 (A) e PNT-2 (B) foram tratadas com bVE, hVE, pVE e pnVE. Apenas o tratamento com VE do câncer (bVE e pVE) aumentou a proliferação nas linhagens celulares normais, o que sugere que essas VE estejam colaborando com a transformação das células normais. Os dados são expressos como a média e desvio padrão entre as triplicatas ($p < 0,05$).

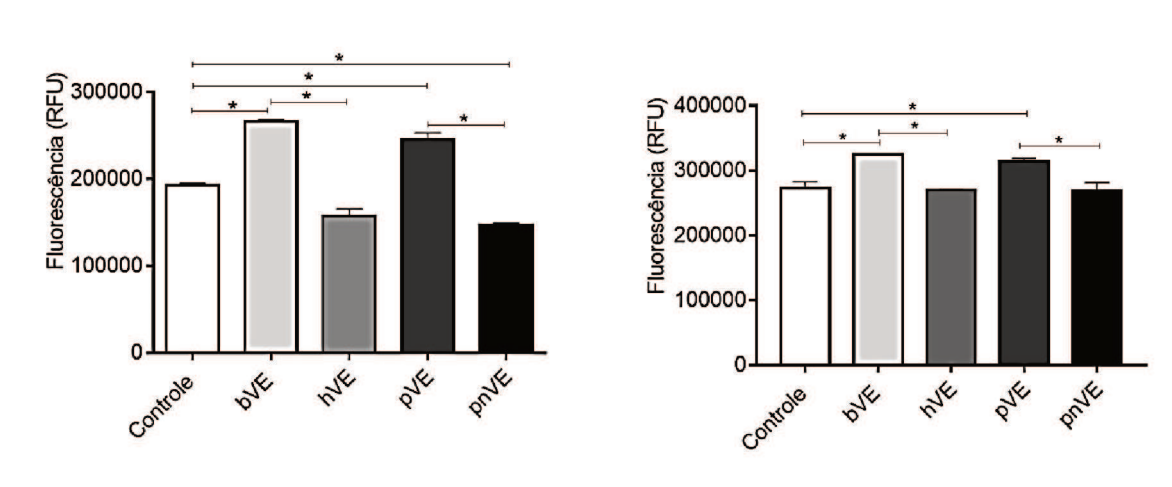
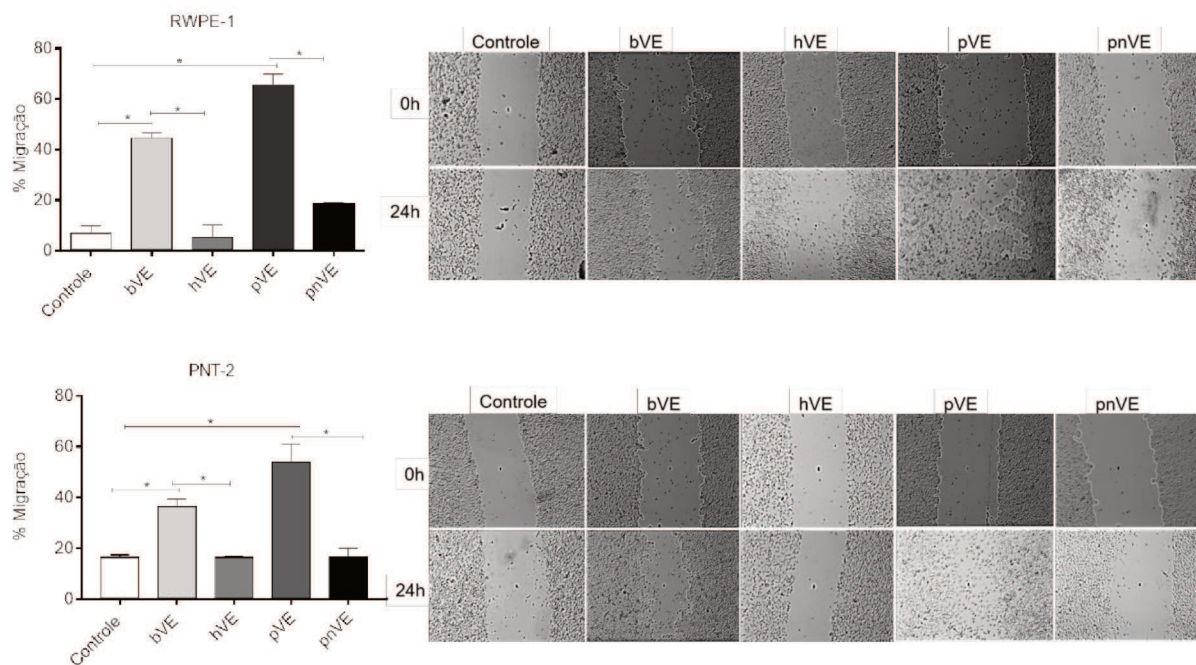


Figura 10. Avaliação da influência do tratamento de VE na migração. As linhagens celulares RWPE-1 (A) e PNT-2 (B) foram tratadas com bVE, hVE, pVE e pnVE. Após 24 h de tratamento, as VE cancerosas induziram maior capacidade de migração nas células normais. À direita, imagens representativas do ensaio de migração às 0 h (acima) e 24 h (abaixo). Os dados são expressos como a média e desvio padrão entre as triplicatas, ($p < 0,05$).



4.2. Análises com cfDNA

4.2.1. Caracterização e quantificação do cfDNA

Os fragmentos de cfDNA avaliados nos três *pools* por CE, mostraram diferentes tamanhos. No *pool* de cfDNA N os tamanhos variaram entre 174 – 7387 pb com alguns fragmentos não quantificados acima de 10.380 pb (Figura 11 A), no *pool* T1/T2 entre 26 – 4912 pb (Figura 11 B) e no *pool* T3/T4 os tamanhos foram entre 21 – 53 pb (Figura 11 C).

Figura 11. Eletroferogramas capilares mostrando o tamanho do cfDNA dos respectivos *pools* N (A), T1/T2 (B) e T3/T4 (C). Em cada electroferograma podem ser vistos dois picos principais, um a 35 pb e um a aproximadamente 10.380 pb. Esses picos correspondem aos dois marcadores. A fluorescência relativa desses marcadores é então usada para calcular o tamanho das amostras desconhecidas. Assim, qualquer pico da linha de base, excluindo os marcadores, indica o tamanho de cfDNA.

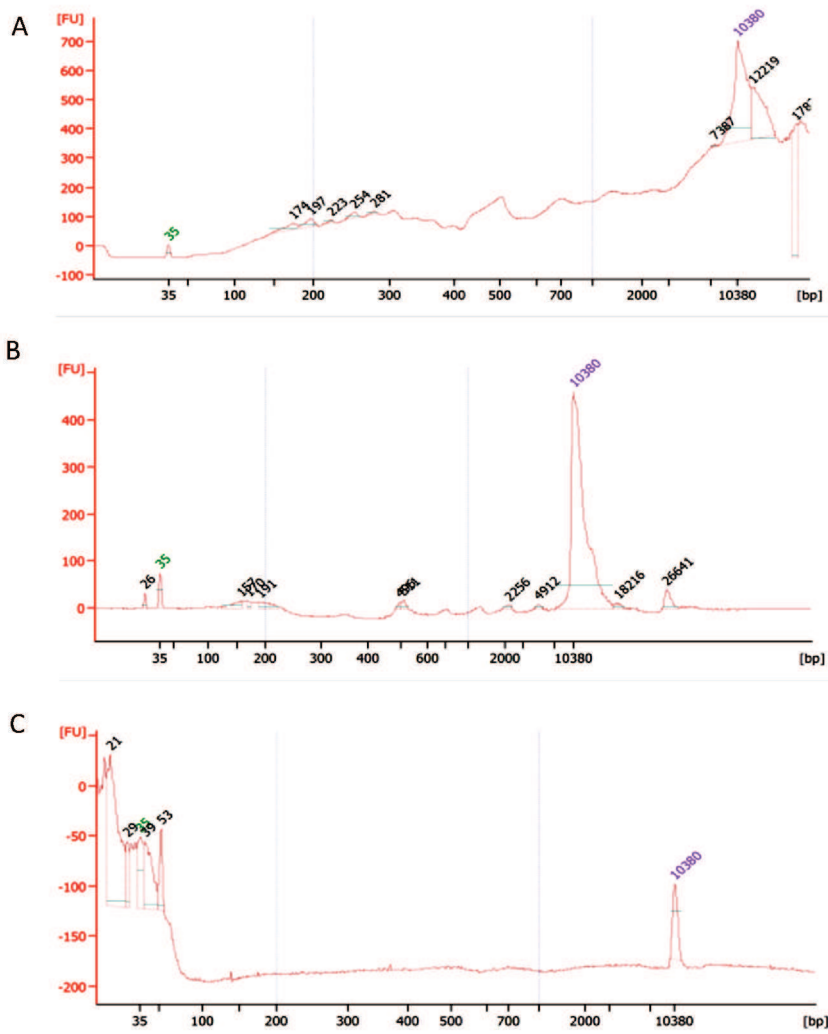
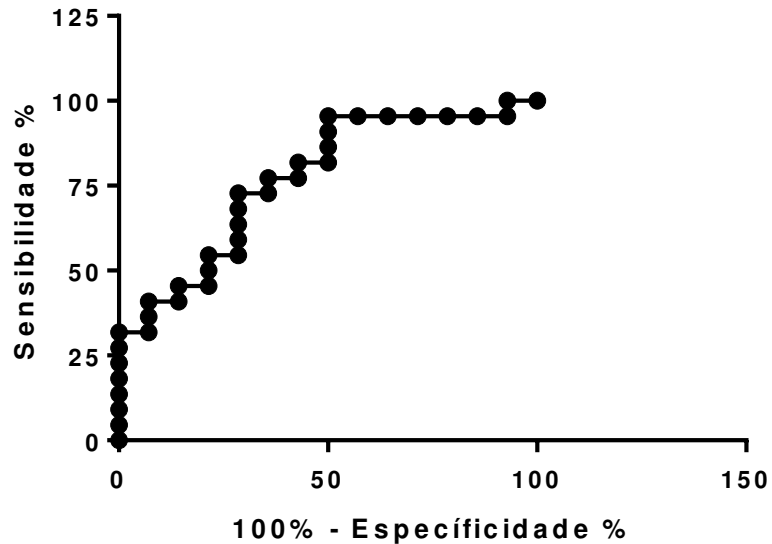


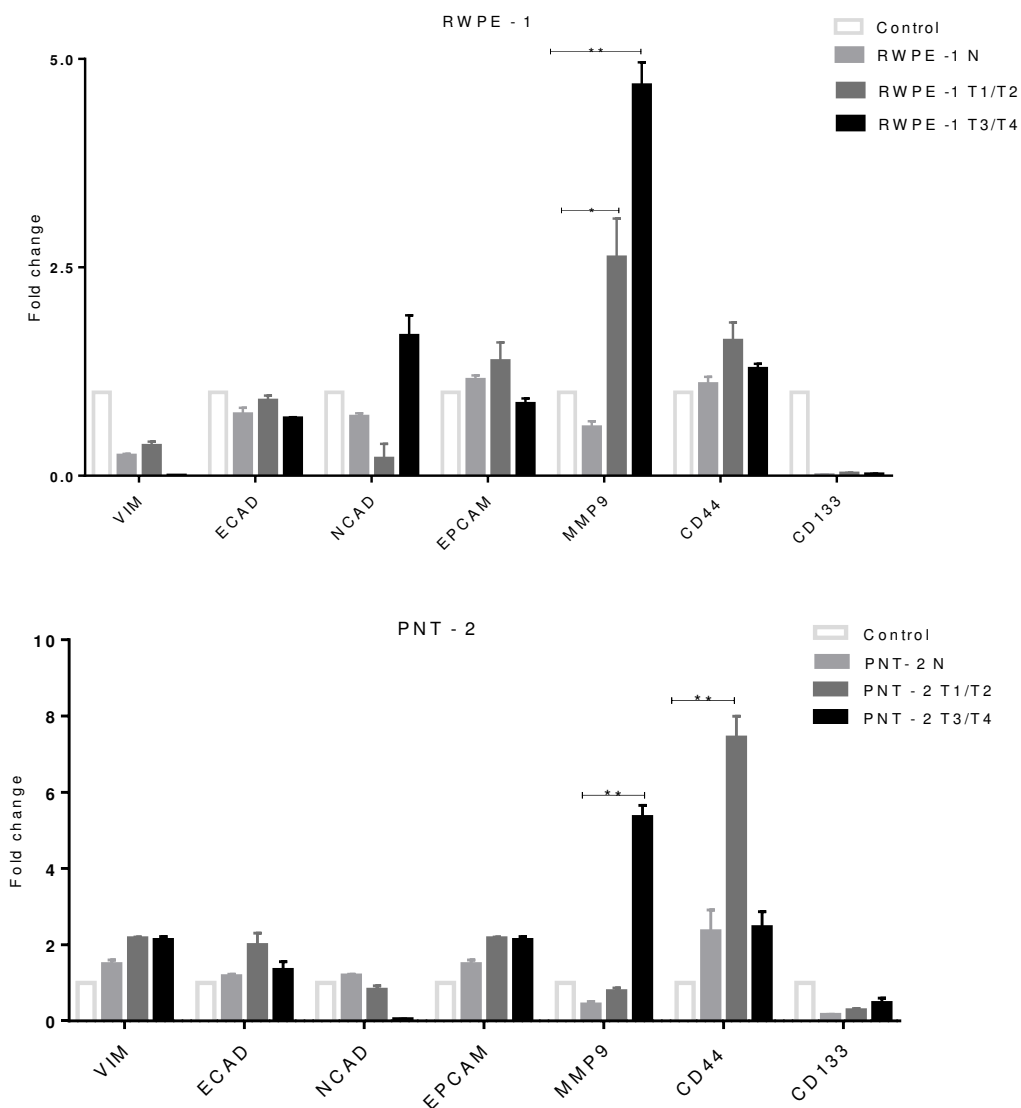
Figura 13: Curva ROC para distinguir pacientes com câncer de próstata de indivíduos saudáveis. O *cutoff* > 2,934 apresentou sensibilidade de 72% e especificidade de 71% para discriminar pacientes com CaP dos controles.



4.2.2. Análise funcional do cfDNA

Quando avaliada a contribuição do cfDNA isolado de pacientes com CaP na alteração da expressão gênica nas linhagens celulares PNT-2 e RWPE-1, foi verificado uma super expressão dos genes MMP9 e CD44 na linhagem celular PNT-2 e do gene MMP9 na linhagem celular RWPE-1. Para os demais genes avaliados a alteração da expressão gênica não foi estatisticamente significativa (figura 14).

Figura 14. Análise da expressão gênica das linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 após tratamento com cfDNA. Os genes MMP9 e CD44 foram os que se apresentaram diferentemente expressos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



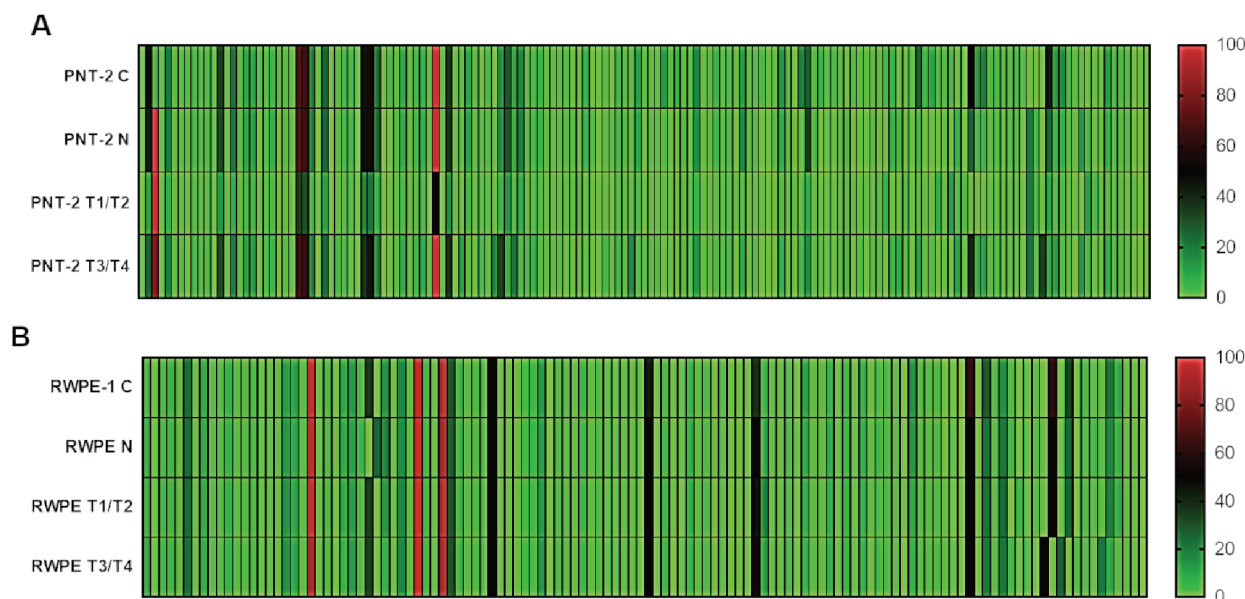
4.2.3. Análise Metabolômica

Além da expressão destes genes, também foi realizada a partir do sobrenadante das linhagens celulares PNT-2 e RWPE-1 tratadas com cfDNA dos grupos N, T1/T2 e T3/T4 uma análise de espectrometria de massa (EM), a fim de verificar a composição destas amostras comparadas ao controle (células não tratadas).

Os resultados obtidos demonstraram diferenças na composição e na intensidade de alguns metabólitos entre os grupos avaliados, conforme apresentado no *heat map*. Neste, cada coluna corresponde a um metabólito diferente e os níveis de cada metabólito, entre as diferentes amostras, é mostrado pela variação de cores (figura 15). Em algumas colunas pode ser verificado a presença de determinados metabólitos apenas nas linhas de tratamento com cfDNA derivado de pacientes com CaP (T1/T2 ou T3/T4). Entretanto, há também alguns metabólitos que foram ausentes ou menos abundantes nesses tratamentos, mas presentes no controle (C) e/ou no tratamento com cfDNA do grupo N.

Figura 15. Heat map da abundância dos metabólitos presente nos tratamentos com cfDNA.

Cada coluna representa um metabólito diferente obtido pela análise metabolômica. **A** - Sobrenadante de células da linhagem PNT-2 tratadas com o *pool* de cfDNA N, T1/T2, T3/T4 e controle (C). **B** - Sobrenadante de células da linhagem RWPE-1 tratadas com o *pool* de cfDNA N, T1/T2, T3/T4..



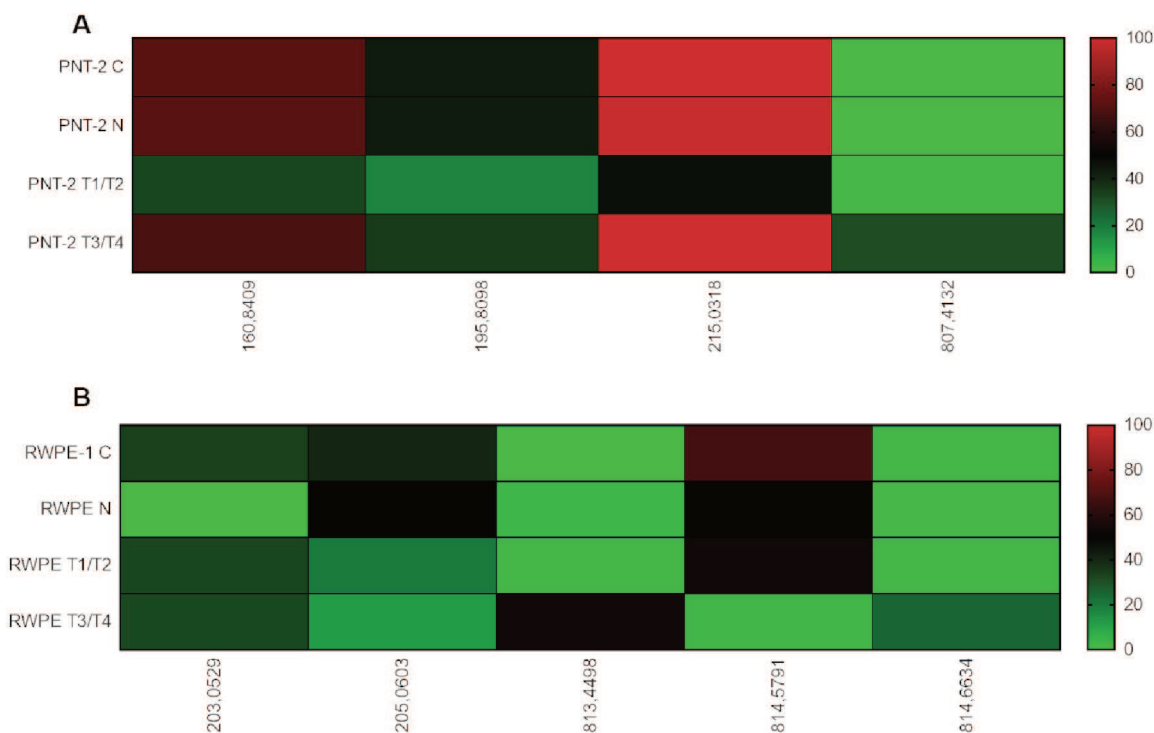
No total foram obtidas as porcentagens de abundância de 155 metabólitos na análise metabolômica do sobrenadante da linhagem PNT-2 e de 121 metabólitos da análise do sobrenadante da linhagem RWPE-1.

Na linhagem PNT-2 os metabólitos de m/z 160,84; 195,80; 215,03; 713,47 e 807,47 foram os que apresentaram variações significativas dos níveis entre os tratamentos e o controle, na análise do modo negativo. Os metabólitos 160,84; 195,80; e 215,03 foram metabólitos menos abundantes no tratamento com cfDNA T1/T2

($p < 0,01$). Já o metabólito 807,41 apresentou níveis elevados no tratamento com cfDNA T3/T4 em relação aos demais tratamentos e ao controle ($p < 0,01$), figura 16A.

Na linhagem RWPE-1 os metabólitos analisados pelo modo positivo que apresentaram variação, estatisticamente significativa, entre os tratamentos e o controle foram os de m/z: 203,05; 205,06; 813,44; 814,57 e 814,66. O metabólito 203,05 teve níveis menores no tratamento com cfDNA N, ($p < 0,0001$), permanecendo inalterado no controle e no tratamentos com cfDNA derivado dos pacientes com CaP. Os metabólitos 205,06 e 814, 57 foram menos abundantes nas células tratadas com cfDNA T3/T4 ($p < 0,05$), em contraste com os metabólitos 813, 44 e 814,66 que apresentaram níveis elevados, neste mesmo tratamento, comparado aos demais tratamentos e controle ($p < 0,01$), figura 16B.

Figura 16. Heat map dos metabólitos diferentemente abundantes no sobrenadante das células PNT-2 (A) e RWPE-1 (B) após tratamento com os pools de cfDNA (N, T1/T2, T3/T4).



4.2.4. Análise de Quimiometria

Para avaliar mais claramente os dados obtidos pela metabolômica, técnicas estatísticas foram empregadas. A técnica de análise multivariada através da PCA foi utilizada para avaliar todas as informações de m/z e as porcentagens de intensidade obtidas em todos os espectros gerados.

Os dados da análise de EM foram adquiridos nos modos positivo e negativo. Sendo que o melhor agrupamento foi adquirido no modo positivo para a RWPE-1 e no modo negativo para a PNT-2. Na análise quimiométrica do modo positivo e negativo para as respectivas células foi utilizado a matriz descrita na tabela 4.

4.2.4.1. Análise modo negativo PNT-2

Para as amostras A1, A2, A3, A4, A5 e A6 as PCA's foram construídas usando como pré-processamento o *mean center* e todas obtiveram 3 PC's e diferenciaram por completo os dois conjuntos. A variância de cada PCA é dada na tabela 5.

Tabela 5. Variância das amostras obtidas a partir da análise de quimiometria.

Conjunto	Variância (%)
A1	98,73
A2	99,36
A3	97,92
A4	99,24
A5	94,05
A6	98,42

4.2.4.2. Análise modo positivo RWPE-1

Para as amostras A7, A9, A11 e A12 as PCA's foram construídas usando como pré-processamento o *mean center* e o conjunto A7 obteve 4 PC's e 98,44%

de variância; o restante obteve 3 PC's e 93,35%, 94,07% e 94,96% de variância explicada respectivamente. Os modelos conseguiram uma boa diferenciação entre os dois grupos. Enquanto, A8 e A10: As PCA's foram construídas usando como pré-processamento o *mean center*, obtendo ambas, 3 PC's e respectivamente, 95,08% e 94,19% de variância explicada. O modelo diferenciou os dois grupos, porém, com distanciamento entre as amostras pertencentes ao mesmo grupo.

Os PCA construídos a partir das análises quimiométricas estão ilustrados nas figuras 17 e 18.

Figura 17. PCA obtidas na quimiometria. A - PCA obtida entre os grupos PNT-2 C e PNT-2 N. B - PCA obtida entre os grupos PNT-2 C e PNT-2 T1/T2. C - PCA obtida entre os grupos PNT-2 C e PNT-2 T3/T4. D - PCA obtida entre os grupos PNT-2 N e PNT-2 T1/T2. E - PCA obtida entre os grupos PNT-2 N e PNT-2 T3/T4. F - PCA obtida entre os grupos PNT-2 T1/T2 e PNT-2 T3/T4.

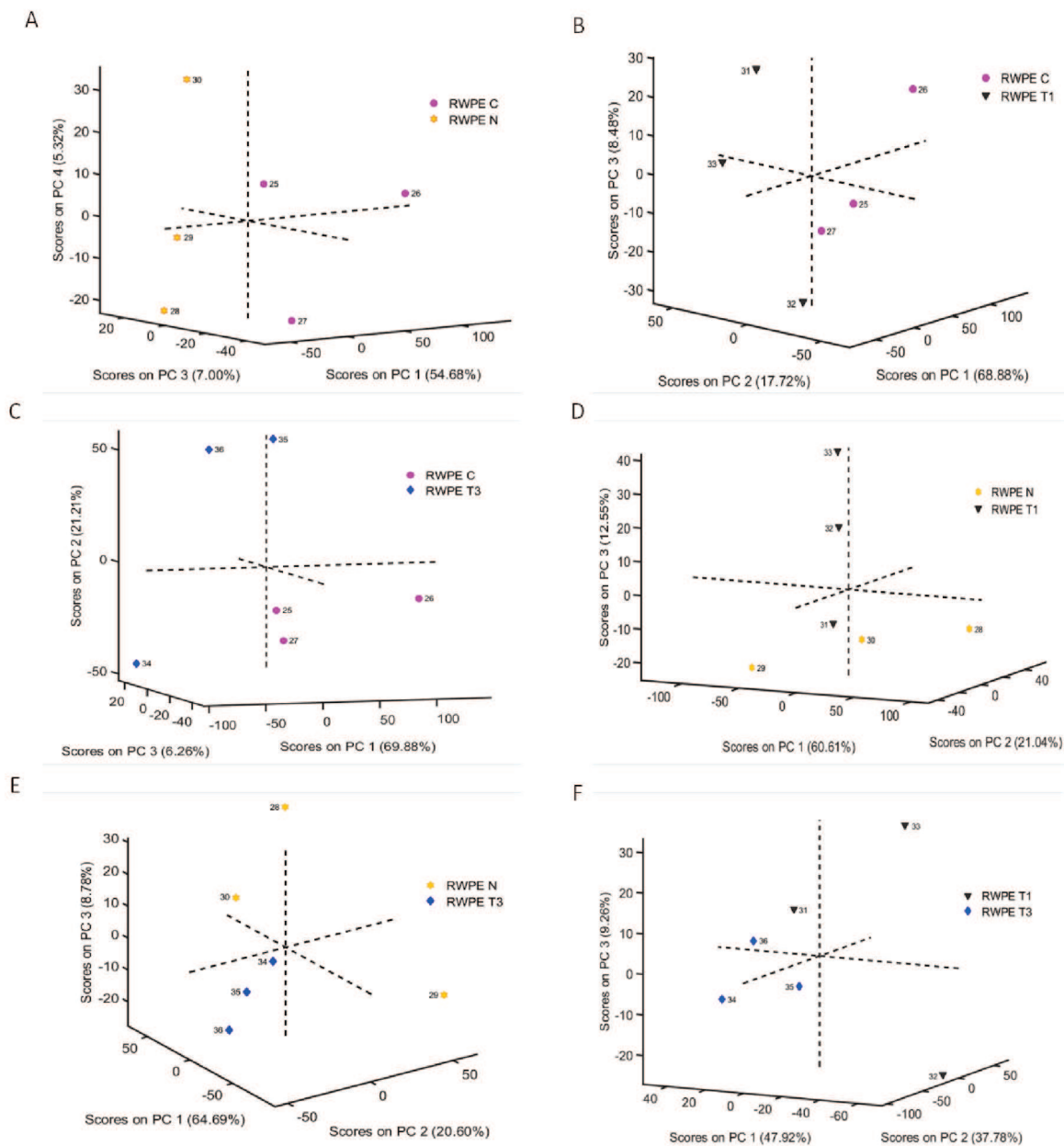
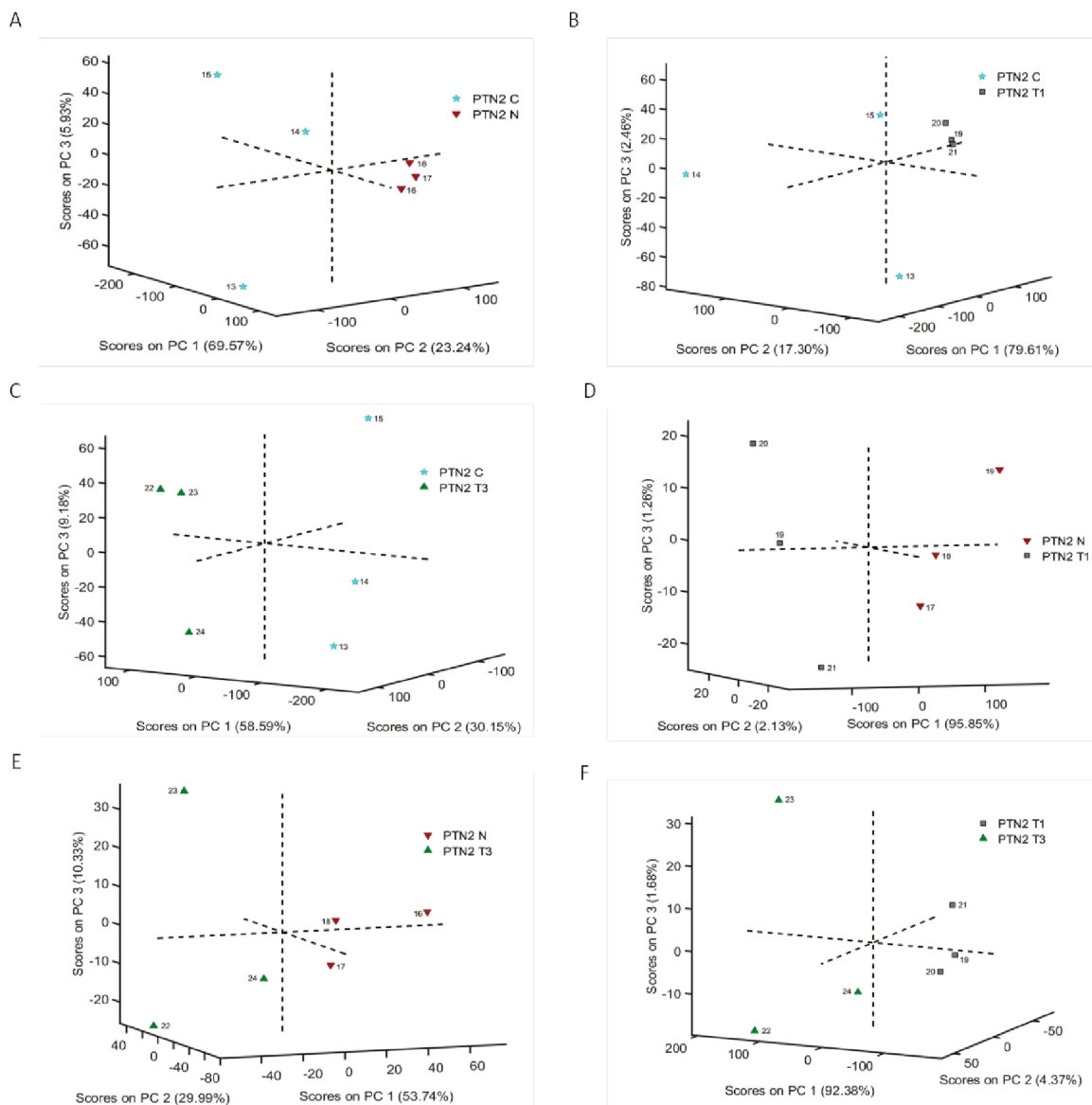


Figura 18. PCA obtidas na quimiometria. **A** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 C e RWPE-1 N. **B** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 C e RWPE-1 T1/T2. **C** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 C e RWPE-1 T3/T4. **D** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 N e RWPE-1 T1/T2. **E** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 N e RWPE-1 T3/T4. **F** - PCA obtida entre os grupos RWPE-1 T1/T2 e RWPE-1 T3/T4.



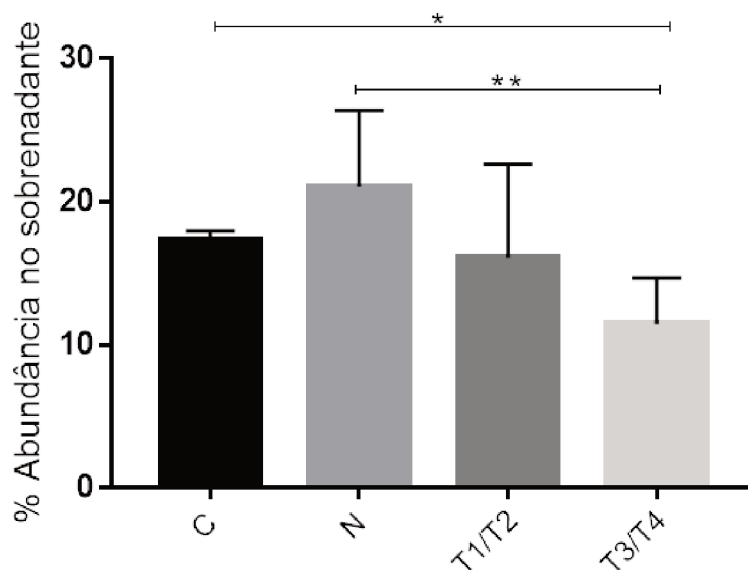
Na realização do PCA para análise de separação entre os tratamentos N, T1/T2 e T3/T4 e controle, os gráficos mostram que a primeira componente principal (PC1) responde pela maior porcentagem de contribuição para os agrupamentos em ambas as linhagens celulares. Desta forma, a partir da PC1 foi selecionado os compostos que tiveram maior contribuição para a separação dos grupos e feito a identificação destes por EM.

4.2.5. Identificação dos metabólitos

No modo negativo utilizado para as análises de PNT-2 foi verificado o metabólito de m/z 339,2 e no modo positivo para análise de RWPE-1 os metabólitos de m/z 205, 437, 701 e 814. Estes metabólitos foram os mais relevantes para as análises de separação entre os grupos tratados e o controle, pois são os metabólitos que apareceram em maior intensidade na PC1.

O metabólito 205 foi identificado por EM como o triptofano, esse metabólito apresentou níveis menores no sobrenadante das células tratadas com cfDNA T1/T2 e T3/T4 comparado ao controle e ao tratamento com cfDNA N. No entanto, apenas no tratamento com T3/T4 essa redução foi estatisticamente significativa (figura 19).

Figura 19. Níveis de triptofano no sobrenadante das células RWPE-1 após 24 h de incubação com os cfDNA dos *pools* N, T1/T2 e T3/T4. O maior consumo de triptofano foi no tratamento com cfDNA T3/T4, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Além desses, outros metabólitos analisados no modo negativo de m/z 160,84; 195,80; 215,03; 713,47 e 807,47 e analisados no modo positivo de m/z 203,05; 205; 813,44; 814,57 e 814,66 mostraram-se diferencialmente abundantes. Desta forma, esses metabólitos também foram selecionados para futura identificação.

5. DISCUSSÃO

Embora muitos avanços científicos tenham ocorrido ao longo dos anos, o câncer ainda é uma das principais causas de morte (STEWART et al., 2017, THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2019). Desta forma, são necessários estudos mais aprofundados sobre a biologia das células cancerosas e seu microambiente para que se possa compreender mais sobre esta doença e propor novas estratégias de diagnóstico e tratamento, bem como diminuir a mortalidade e aumentar a qualidade de vida dos pacientes.

A comunicação celular é um evento biológico considerado importante no desenvolvimento e na progressão do câncer, assim, muitas pesquisas estão direcionadas ao seu estudo e compreensão. Ao considerar o microambiente tumoral, a comunicação e as interações celulares conduzem eventos cruciais para que as células cancerosas consigam se estabelecer em sítios primários e posteriormente, em sítios metastáticos. Dentre as formas que as células tumorais podem se comunicar e promover mudanças no microambiente circundante a liberação de VE e cfDNA tem sido apresentada como uma interessante alternativa.

Além do conhecimento sobre a forma de comunicação e promoção do câncer, VE e cfDNA podem ser também uma fonte acessível de novos biomarcadores para o diagnóstico e até mesmo para o acompanhamento da progressão da doença durante o tratamento (THÉRY, 2015; GRAVINA; SEDIVY; VIJG, 2016). No caso do CaP, alguns trabalhos já apresentaram potenciais moléculas, encontradas em VE, que podem servir como biomarcadores da doença, além disso, a quantidade e o tamanho das VE também podem informar sobre o estadiamento e sobre a progressão do CaP (VALENTINO et al., 2017, VLAEMINCK-GUILLEM, 2018).

Nesse sentido, o presente estudo se propôs a analisar VE e cfDNA isolados a partir de pacientes com CaP e de indivíduos controles, bem como analisar distintas alterações funcionais em células normais da próstata oriundas do tratamento destas células com os *pools* de VE e cfDNA.

Previamente à análise funcional com as linhagens celulares, as VE e os cfDNA foram isolados e o tamanho e a concentração estimados, pois estudos têm

mostrado que células cancerosas podem liberar vesículas em maior quantidade e tamanho, possivelmente, para favorecer a comunicação intercelular e o crescimento tumoral (ZLOTOGORSKI-HURVITZ et al., 2016, MATSUMOTO et al., 2016, VAGNER et al., 2018). Esses dados corroboram com os demonstrados neste trabalho, uma vez que VE isoladas de pacientes com CaP apresentaram tamanho significativamente maior quando comparadas as VE dos grupos controles (hVe e pnVE).

Já a análise por CE dos fragmentos do cfDNA mostrou que há também variação entre os tamanhos dos fragmentos de cfDNA isolados dos grupos N, T1/T2 e T3/T4. Mas curiosamente, os tipos de fragmentos do grupo T3/T4 foram menores em relação ao demais grupos, possivelmente por consequência do estadiamento do tumor ou mesmo das terapias aplicadas aos pacientes. Nos grupos N e T1/T2 foram verificados fragmentos maiores, próximo ou acima de 10.000 pb, provavelmente originados por necrose celular, conforme observado por Bronkhorst e colaboradores (2016).

Quando avaliada a concentração de cfDNA por qPCR essa foi maior no plasma de pacientes com CaP (T1/T2 e T3/T4) em relação a concentração encontrada no plasma daqueles indivíduos considerados saudáveis. Esse tipo de análise a partir do cfDNA ainda gera controvérsia sobre se há uma maior ou menor concentração e integridade associada ao câncer. Wang et al. (2003) relatou que a integridade do cfDNA baseada no gene β -actina foi maior em 61 pacientes com câncer de mama e ginecológico em comparação com 65 pacientes não neoplásicos (WANG et al., 2003).

No entanto, existem trabalhos conflitantes, como o de Madhavan e colaboradores (2014), no qual demonstraram que a diminuição da integridade do cfDNA correlaciona-se com estadiamentos mais agressivos do câncer. Os autores notaram que a diminuição da integridade de cfDNA implica em taxas apoptóticas mais altas, e que o aumento da apoptose se correlaciona com maior proliferação tumoral. Isso, por sua vez, indica que células apoptóticas e não células necróticas, são a principal fonte de cfDNA, pelo menos no câncer (MADHAVAN et al., 2014).

Outros estudos têm buscado relacionar a concentração e a integridade de cfDNA aos diferentes estadiamentos do câncer para distinção dos casos de hiperplasia benigna. No CaP, o grupo de Feng et al. (2013) verificou diferenças

significativas na integridade do cfDNA e na sua concentração entre os pacientes com CaP e pacientes com HPB. De acordo com a integridade do cfDNA o CaP pode ser diferenciado de HPB com uma sensibilidade de 81,7% e uma especificidade de 78,8% (AUC = 0,910). Já avaliando a concentração do cfDNA, pode se diferenciar os grupos estudados por uma sensibilidade de 73,2% e uma especificidade de 72,7% entre os pacientes (AUC = 0,864) (FENG et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados também pelo grupo de Allen et al. (2004) que por meio das análises da curva ROC indicaram uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 73% para distinguir entre pacientes com CaP e pacientes com HPB.

Já os resultados obtidos no presente trabalho, relacionados a quantificação de cfDNA, mostraram uma sensibilidade de 72% e uma especificidade de 71% para discriminar pacientes com CaP dos pacientes controle (AUC = 0,7695). Este conjunto de dados sugere que a quantificação do DNA plasmático livre de células pode ter um papel importante no diagnóstico da doença maligna da próstata.

Após análises de caracterização das VE e dos cfDNA foram feitas análises funcionais para adquirir uma melhor compreensão sobre os efeitos induzidos pelas VE e pelos cfDNA, derivados de pacientes com CaP, nos processos celulares. Para isso, as linhagens celulares PNT-2 e RWPE-1 foram tratadas com os respectivos *pools* de VE e cfDNA em diferentes ensaios.

Evidências científicas recentes mostram que VE participam na estimulação de processos como invasão e migração celular em vários tipos de câncer (ATAY et al., 2014). Portanto, VE liberadas por células tumorais são capazes de modular a matriz extracelular através da secreção de proteinases chave, ou ácidos nucleicos que podem alterar a expressão gênica e promover diferentes alterações na célula (UMEZU et al., 2013, AN et al., 2015).

O mecanismo de ação das VE liberadas no microambiente tumoral sob as células normais não é ainda totalmente compreendido (VAN DOORMAAL et al., 2009). Estudos recentes demonstram que o conteúdo biológico das VE é altamente variável (KREGGER et al., 2016). Este fato corrobora com a hipótese que as VE isoladas de fluidos biológicos podem induzir diferentes respostas em células receptoras (SALEH et al., 2019).

Moléculas como mRNA, miRNA, DNA, lipídeos e proteínas encontradas dentro das VE são identificadas como funcionais depois de serem internalizadas por células receptoras (BEBELMAN et al., 2018). Portanto, mRNAs transportados por VE podem ser traduzidos, alterando perfil proteômico da célula-alvo. Além disso, miRNA transportado por VE também podem desempenhar papéis importantes na assinatura proteômica, uma vez que modulam eventos biológicos em níveis de transcrição e pós-transcrição (CROCE, 2009). Mesmo pequenas alterações causadas por essas moléculas são conhecidas por afetar a proliferação celular, a apoptose, a diferenciação celular e o controle do ciclo celular; explicando porque as VE são importantes no processo carcinogênico (MORELLO et al., 2013)

A capacidade de modulação da matriz extracelular, já citada acima, pode favorecer processos como a TEM, o que promove a capacidade dessas células migrarem, sendo isso, um evento importante para células neoplásicas durante a invasão tumoral e a metástases (BRABLETZ et al., 2018)

Aqui, foi demonstrado que as bVE e pVE após internalizarem nas células causaram importantes alterações no perfil da expressão de genes relacionados a TEM e a outros processos envolvidos na progressão do CaP. A perda concomitante de E-caderina e o ganho de expressão de N-caderina tem sido relatada recentemente em tumores epiteliais malignos, bem como a expressão de vimentina. Esse fenômeno, que aumenta tanto a mobilidade quanto a invasividade das células epiteliais neoplásicas, também tem sido usado como um marcador da ocorrência de TEM (PYO et al., 2007, SETHI et al., 2011).

Neste contexto, o aumento da migração e da proliferação das linhagens celulares RWPE-1 e PNT-2 apresentados nesse trabalho, pode ser uma resposta às alterações genéticas sofridas pelas células após o tratamento com os *pools* bVE e pVE. Além dos genes envolvidos diretamente com a TEM no câncer, outros genes super expressos, como ALDH1, ANXA1, EGFR, MDM2, PBOV, TMPRSS2 e cMYC, já foram associados ao aumento da migração e da proliferação celular no CaP e em outros tipos de câncer (PRENSNER et al., 2014, BIZZARRO et al., 2015), bem como, relacionados a transformação maligna e a um pior prognóstico do câncer (BELVEDERE et al., 2014, SHI; GU, 2012, SLABÁKOVÁ et al., 2015, LEITE et al., 2001, DEMICHELIS et al., 2007, WADE; LI; WAHL, 2013, DI LORENZO et al., 2002). Também foi observado que as VE isoladas de pacientes com CaP (bVE

e pVE) tiveram ação semelhante nas linhagens celulares, RWPE-1 e PNT-2, sugerindo que essas VE podem conter uma carga similar, liberada pelas células cancerígenas. E assim, podem modular sítios distantes do tumor primário ao alcançarem a corrente sanguínea e circularem pelo organismo.

Diante disso, os resultados aqui obtidos demonstram a capacidade das VE encontradas no plasma de pacientes com CaP alterarem a expressão gênica e conseqüentemente iniciarem eventos celulares que favoreçam a TEM, a migração e a proliferação celular, atuando desta forma na transformação maligna das células receptoras.

Mesmo que os resultados tenham mostrado um comportamento diferenciado nas células tratadas com os *pools* das VE malignas não se pode prever qual tipo de carga presente nessas VE desencadeou tais alterações, pois as VE possuem diferentes moléculas biológicas que podem desempenhar diferentes funções nas células receptoras. Logo, o cfDNA que pode ser encontrado livre na circulação ou encapsulado por VE foi selecionado para que, além de estudos de caracterização e quantificação, fossem realizadas análises complementares funcionais de expressão gênica e secreção de metabólitos, a fim de verificar se essa molécula poderia, de forma isolada, participar também de alterações malignas em células normais prostáticas.

A busca por alterações em células normais provocadas por cfDNA parte da hipótese da genometastase proposta pelo grupo de García-Olmo (2001). Esta hipótese sugere que processos como a metástases podem se desenvolver como resultado da transfecção de células suscetíveis em órgãos-alvo distantes com oncogenes dominantes que circulam no plasma e são derivados do tumor primário (GARCÍA-OLMO; GARCÍA-OLMO, 2001; GARCÍA-CASAS; GARCÍA-OLMO; GARCÍA-OLMO, 2017).

Neste trabalho, o aumento da expressão dos genes MMP9 e CD44, notável apenas nas células tratadas com os *pools* de cfDNA derivado de pacientes com CaP, sugere a ação desse cfDNA na alteração gênica das células normais, já que com cfDNA derivado de pacientes saudáveis não houve alterações significativas entre os genes avaliados. Curiosamente, o aumento de MMP9 e CD44 está associado a células cancerígenas e tem sido foco de muitos estudos para

compressão do processo de TEM e progressão do CaP (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; ZÖLLER, 2011).

As MMPs fazem parte da família de proteases dependentes de zinco e desempenham uma importante função na degradação proteolítica de componentes estruturais da matriz extracelular (MANFREDI et al., 2008). No CaP as MMP2 e MMP9, em particular, já foram associadas a metástase, uma vez que níveis elevados de ambas as metaloproteases foram encontrados no plasma e na urina de pacientes metastáticos (MOSES et al., 1998; GOHJI et al., 1998). Aalinkeel e colaboradores (2011) mostraram que o aumento de MMP9 na linhagem celular LNCaP elevou consequentemente a invasividade dessa célula confirmando neste estudo o papel da MMP9 na remodelação tecidual associada à invasão do tumor de próstata (AALINKEEL et al., 2011).

Nesse mesmo contexto, o aumento de CD44, uma molécula de adesão celular, tem sido também associado a processos neoplásicos. O papel do CD44 na tumorigênese é devido à sua ligação aos componentes da matriz extracelular, incluindo o ácido hialurônico, osteopontina, e às moléculas mensageiras, como os fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral (NAOR et al., 2002). Além disso, Li e colaboradores (2017) mostraram que o CD44 está envolvido também no metabolismo de glicose das células do CaP. Embora ainda não tenha elucidado os principais mecanismos de regulação para esse evento, os autores descrevem que o CD44 pode modular o fenótipo agressivo de células cancerosas da próstata por regulação da expressão de enzimas chave do metabolismo da glicose aumentando dessa forma, a invasão, proliferação e a migração celular (LI et al., 2017).

A atuação do cfDNA em alterações genéticas foi recentemente abordado por Mitra e colaboradores et al., (2015) que afirmaram ser o cfDNA, uma molécula biologicamente ativa, que pode ter funções deletérias significativas na célula receptora. De acordo com seus resultados, eles concluíram que o cfDNA são liberados pelas células continuamente, e podem entrar em células saudáveis e integrar em seu genoma, causando alterações na sequência do DNA como: deleções, duplicações e rearranjos (MITTRA et al., 2015). Além disso, alterações podem ser obtidas por vias de sinalização ativadas pela interação do cfDNA com algum receptor ou aumentando os níveis transcricionais de determinados genes.

Kostyyuk e colaboradores (2012) mostraram que os fragmentos de cfDNA diminuíram a atividade da caspase, uma enzima apoptótica presente em células tronco mesenquimais. Desta forma, foi visto que o cfDNA pode influenciar significativamente a atividade funcional das células ativando as vias de sinalização e diminuindo níveis de apoptose (KOSTYUK et al., 2012).

Além da alteração da expressão gênica nas células receptoras a expressão diferencial de algum metabólito chave pode também servir como potencial biomarcador para detectar alterações iniciais em células que tiveram contato com cfDNA. Assim, a identificação de vias metabólicas disfuncionais através da metabolômica pode ser uma maneira interessante de identificar biomarcadores do CaP (BOROUGHES; DEBERARDINIS, 2015).

A análise dos dados de metabolômica, obtidos neste trabalho, mostrou alguns metabólitos expressos diferentemente após os tratamentos com cfDNA, derivado de pacientes com CaP (T1/T2 ou T3/T4), e outros que foram diferentemente expressos apenas no tratamento com cfDNA N. As alterações observadas nos tratamentos com cfDNA (T1/T2 ou T3/T4) podem servir como uma excelente fonte de potenciais biomarcadores tumorais, enquanto as alterações observadas nos tratamentos com cfDNA N, confirmam a participação do cfDNA nos diferentes mecanismos biológicos, conforme já apresentado pelo grupo de Zingova (2017), que mostrou a participação do cfDNA derivado de plasma e soro de indivíduos saudáveis no controle da resposta imune (ZINKOVA et al., 2017).

Além disso, a análise de quimiometria realizada para verificar os metabólitos que apresentaram maior variação, responsáveis portanto, pelo agrupamento das amostras, mostrou que alguns metabólitos são capazes de diferenciá-las. Para o estudo de quimiometria, a PCA é possivelmente a técnica mais empregada na análise multivariada (CAMPANELLA; DE ANGELIS; VISCO, 2003; GUEBEL; TORRES, 2013). A PCA consiste em uma abordagem matemática que permite um redimensionamento dos dados multivariados originais para um menor conjunto de variáveis sem afetar a relevância das informações originais. Esses novos dados geram conjuntos de scores que trazem informações sobre as amostras e as variáveis, respectivamente (ARRUDA et al., 2003). As novas disposições relacionam uma amostra à outra, de maneira que aquelas que se aproximam apresentam um perfil semelhante, enquanto aquelas que se distanciam

possuem propriedades diferentes. Assim, é possível classificar as amostras do estudo em grupos distintos que vão permitir avaliar quais são as variáveis que diferenciam os grupos (TRYGG; LUNDSTEDT, 2007).

Nos gráficos apresentados observa-se que as triplicatas de cada grupo estão dispostas espacialmente em cada PCA, e observando cada replicação é possível avaliar a proximidade entre elas. Comparando as análises dos PCA's entre as células PNT-2 a proximidade das réplicas foi maior, o que indica que tais amostras possuem perfil metabólico semelhantes dentro dos grupos avaliados, porém diferentes entre os tratamentos. No entanto, para ambas as linhagens foram indicados os metabólitos que se mostraram variáveis pela análise de PCA e assim permitiram a separação de cada grupo.

O triptofano, um dos metabólitos indicado na análise matemática como contribuinte na separação das classes analisadas, trata-se de um aminoácido já relacionado em outros estudos com o metabolismo de células cancerígenas. De acordo com o Prendergas et al., (2011), os tumores aumentam o consumo deste aminoácido para evitar o controle imunológico (PRENDERGAST, 2011). A degradação triptofano ocorre pela via da quinurenina, onde duas enzimas diferentes, a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO), catalisam a conversão do triptofano em quinurenina, enquanto o triptofano hidroxilase-1 (TPH-1) converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano e fornece precursores para a biossíntese da serotonina. Logo essa via metabólica cria um meio imunossupressor nos tumores pela inibição de linfócitos T e células *natural Killer*, e ativação de células Treg (PLATTEN; WICK; VAN DEN EYNDE, 2012).

Outros estudos têm associado também o câncer à ativação do metabolismo sistêmico do triptofano. Opitz et al. (2011) avaliaram a razão entre quinurenina e triptofano no plasma do paciente como uma medida da atividade de IDO e TDO. Os dados resultantes indicaram que o catabolismo do triptofano pode servir como um biomarcador para monitorar a atividade da doença e a resposta à terapia em pacientes com câncer (OPITZ et al., 2011). Além do triptofano o metabolismo de muitos aminoácidos tem sido foco de maior atenção nas pesquisas com câncer, devido à sua importância para a reprogramação metabólica de células em proliferação. Muitas enzimas das vias metabólicas dos aminoácidos, como as do

triptofano são descritas como imunossupressoras no microambiente tumoral e direcionadas para a terapia do câncer (PLATTEN; WICK; VAN DEN EYNDE, 2012).

Os resultados obtidos pela análise metabolômica apontam para uma diminuição dos níveis de triptofano no meio das células RWPE-1 tratadas com os *pools* T1/T2 e T3/T4, particularmente, o maior consumo de triptofano ocorreu no tratamento com T3/T4, composto pelo cfDNA de pacientes com metástase e, portanto, em um estágio mais avançado do câncer. Essa característica pode ter contribuído por esta alteração significativa nas células que receberam esse cfDNA.

Assim, conectando os eventos já demonstrados em outros estudos, com os dados obtidos no presente trabalho seria limitante pensar que a progressão do câncer não esteja relacionada ao cfDNA liberado por células cancerígenas, bem como as VE que carregam, dentre outras moléculas, cfDNA.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos neste estudo, verificou-se que o tamanho das VE e a concentração do cfDNA podem ser potenciais análises para a triagem do CaP. Além disso, esses componentes extracelulares induziram alterações importantes nas linhagens celulares normais da próstata, como o aumento da expressão de genes relacionados a progressão do CaP e ao processo de TEM, aumento da proliferação e migração celular e alteração de metabólitos.

Em conjunto, portanto, essas alterações celulares demonstram a participação de VE e cfDNA em eventos tumorigênicos, e abrem perspectivas para ensaios de validação dessas alterações em pacientes com CaP e para novos estudos que visem aprofundar a participação dessas moléculas na transformação maligna das células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALINKEEL, R. et al. Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP. **Immunological Investigations**, v. 40, n. 5, p. 447- 464, 2011. <https://doi.org/10.3109/08820139.2011.557795>

ALBERTS, B. et al. Sinalização celular. In:_. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

AKERS, J. C. et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n.1, p. 1–11, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Circulating tumor cells: Liquid biopsy of cancer. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 110–118, 2013. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>.

ALIX-PANABIÈRES, C.; SCHWARZENBACH, H.; PANTEL, K. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. **Annual Review of Medicine**, v. 63, p. 199-215, 2012. [https://doi: 10.1146/annurev-med-062310-094219](https://doi:10.1146/annurev-med-062310-094219)

AN, T. et al. Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v.4, p.1-15, 2015. [https://doi: 10.3402/jev.v4.27522](https://doi:10.3402/jev.v4.27522)

ANDRIOLE, G. L. et al. Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 2, p. 125–132, 2012. [https://doi: 10.1093/jnci/djr500](https://doi:10.1093/jnci/djr500)

ARRUDA, M. A. Z. et al. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria : pca e pca de imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38–50, 2003.

ATAY, S. et al. Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2014. <https://doi: 10.1073/pnas.1310501111>.

BEACH, A. et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 1, p. 14, 2014. <https://doi: 10.1186/1757-2215-7-14>

BEBELMAN, M. P. et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 188, p. 1-11, 2018. <https://doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>.

BECKER, A. et al. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. **Cancer Cell**, v.30, n. 6, p. 836-848, 2016. <https://doi: 10.1016/j.ccell.2016.10.009>.

BELVEDERE, R. et al. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 961, p. 1-15, 2014. <https://doi: 10.1186/1471-2407-14-961>

BENDICH, A.; WILGZOK, T.; BORENFREUND, E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. **Science**, v. 148, n. 3668, p. 374–376, 1965. <https://doi:10.1126/science.148.3668.374>

BERGER, M. F. et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 214–220, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature09744>

BIZZARRO, V. et al. Annexin A1 is involved in the acquisition and maintenance of a stem cell-like/aggressive phenotype in prostate cancer cells with acquired resistance to zoledronic acid.v.6, n. 28, p. 25074-25092, **Oncotarget**, 2015. <https://doi: 10.18632/oncotarget.4725>.

BOROUGHES, L. K.; DEBERARDINIS, R. J. Metabolic pathways promoting cancer

cell survival and growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 4, p. 351–359. 2015. <https://doi: 10.1038/ncb3124>.

BRABLETZ, T. et al. EMT in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.18, p.128-134, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. [s.l: s.n.], 2017.

BRONKHORST, A. J. et al. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 1, p. 157–165, 2016. <https://doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.022>.

CAMPANELLA, L.; DE ANGELIS, G.; VISCO, G. Chemometric investigation of the efficiency of different TiO₂-based catalysts as principal components of TOC photochemical sensors under development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 376, n. 4, p 467-475, 2003. <https://doi:10.1007/s00216-003-1928-8>.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011. <https://doi: 10.1126/science.1203543>.

CHALLACOMBE, B. J.; ROTTENBERG, G. The staging of prostate cancer. In: *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. [s.l: s.n.], 2013.

COLOMBO, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **Journal of cell science**, v. 126, n. 24, p. 5553–65, 2013. <https://doi: 10.1242/jcs.128868>.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 255-89, 2014. <https://doi: 10.1146/annurev->

[cellbio-101512-122326](https://doi.org/10.1056/NEJMr1706174).

CORCORAN, R. B.; CHABNER, B. A. Application of Cell-Free DNA Analysis to Cancer Treatment. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 379, n.18, p. 1754-1765, 2019. [https://doi: 10.1056/NEJMr1706174](https://doi.org/10.1056/NEJMr1706174)

CROCE, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n.10, p. 704-14, 2009. [https://doi: 10.1038/nrg2634](https://doi.org/10.1038/nrg2634).

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 147, p. 1–73, 2017. [https://doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005](https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005).

DEMICHELIS, F. et al. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. **Oncogene**, v. 26, n. 31, p 4596-4599, 2007. [https://doi: 10.1038/sj.onc.1210237](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210237).

DI LORENZO, G. et al. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 11, p. 3438-3444, 2002.

DIAZ, L. A.; BARDELLI, A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 6, p. 579 - 86, 2014. [https://doi: 10.1200/JCO.2012.45.2011](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011).

DIMAKAKOS, A.; ARMAKOLAS, A.; KOUTSILIERIS, M. Novel Tools for Prostate Cancer Prognosis, Diagnosis, and Follow-Up. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/890697>.

FENG, J. et al. Plasma cell-free DNA and its DNA integrity as biomarker to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate-specific antigen. **International Urology and**

Nephrology, v. 45, n. 4, p. 1023–1028, 2013. <https://doi: 10.1007/s11255-013-0491-2>.

FOSTER, B. P. et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 6, p. 379-395, 2016. <https://doi: 10.1080/10408363.2016.1190682>

GARCÍA-CASAS, A.; GARCÍA-OLMO, D. C.; GARCÍA-OLMO, D. Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle of genomestasis theory. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 5, p. 378–388, 2017. <https://doi: 10.5306/wjco.v8.i5.378>.

GARCÍA-OLMO, D. et al. Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genomestasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n.1, p. 61-65, 2012. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.685151>.

GARCIA-OLMO, D. C.; GARCIA-OLMO, D. Biological Role of Cell-Free Nucleic Acids in Cancer: The Theory of Genomestasis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 18, n. 1–2, p. 153–161, 2012. <https://doi: 10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.90>

GARCÍA-OLMO, D.; GARCÍA-OLMO, D. C. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 945, p. 265–75, 2001. <https://doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03895.x>.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v.1796, n.2, p. 293-308, 2009. <https://doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.006>.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 278, n.1, p. 16-27, 2011. <https://doi: 10.1111/j.1742->

[4658.2010.07919.x.](#)

GOHJI, K. et al. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. **International Journal of Cancer**, v. 79, n. 1, p. 96-101, 1998.

GORMALLY, E. et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 635, n.2, p. 105-17, 2007. <https://doi:10.1016/j.mrrev.2006.11.002>.

GRAVINA, S.; SEDIVY, J. M.; VIJG, J. The dark side of circulating nucleic acids. **Aging Cell**, v. 15, n. 3, p. 398-399 2016. <https://doi:10.1111/accel.12454>.

GREENING, D. W. et al. Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 60-71, 2015. <https://doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.008>.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 68, n.16, p. 2667-2688, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>.

GUEBEL, D. V.; TORRES, N. V. Principal Component Analysis (PCA). **Encyclopedia of Systems Biology**. [s.n.]. p. 1739–1743, 2013.

GUSTAFSON, D.; VEITCH, S.; FISH, J. E. Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. 71, p. 1-12, 2017. <https://doi:10.3389/fcvm.2017.00071>.

HANNAFON, B. N.; DING, W. Q. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14240-14269, 2013. <https://doi:10.3390/ijms140714240>.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **The Journal of cell biology**, v. 97, n. 2, p. 329-339, 1983. <https://doi: 10.1083/jcb.97.2.329>.

HEITZER, E. et al. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2017. <https://doi: 10.1038/s41698-017-0039-5>.

HESSVIK, N. P.; LLORENTE, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n.2, p. 193-208, 2018. <https://doi: 10.1007/s00018-017-2595-9>.

JOHNSTONE, R. M. et al. Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9412–9420, 1987.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009. <https://doi: 10.1038/nrc2618>.

KAHLERT, C.; KALLURI, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. **Journal of Molecular Medicine**, 2013. <https://doi: 10.1007/s00109-013-1020-6>.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 431-437, 2009. <https://doi: 10.1172/JCI39104>.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004. <https://doi: 10.1038/nature03097>.

KASTELOWITZ, N.; YIN, H. Exosomes and microvesicles: Identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. **ChemBioChem**, v.15, n. 7, p.923-928, 2014. <https://doi: 10.1002/cbic.201400043>.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, 2010. <https://doi:10.1016/j.cell.2010.03.015>

KIM, D. K. et al. EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 4-7, 2015. <https://doi:10.1016/j.semcd.2015.02.005>.

KIM, H. K. et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: Possible role of a metastasis predictor. **European Journal of Cancer**, v. 39, n.2, p. 184-191, 2003.

KOSTYUK, S. V. et al. Fragments of cell-free DNA increase transcription in human mesenchymal stem cells, activate TLR-dependent signal pathway, and suppress apoptosis. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 68-74, 2012. <https://doi.org/10.1134/S1990750812010052>.

KREGGER, B. T. et al. Microvesicle Cargo and Function Changes Upon the Induction of Cellular Transformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 219, n. 38, p. 19774 –19785, 2016. <https://doi:10.1074/jbc.M116.725705>.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, n. 3, p.178-196, 2014. <https://doi:10.1038/nrm3758>.

LÄSSER, C.; ELDH, M.; LÖTVALL, J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. **Journal of Visualized Experiments**, v. 59, p.1-6, 2012. <https://doi:10.3791/3037>.

LEITE, K. R. et al. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of**

Pathology, Inc, v. 14, n. 5, p. 428–436, 2001. <https://doi:10.1038/modpathol.3880330>

LEON, S. A. S. et al. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. **Cancer Research**, v. 37, p. 646–650, 1977.

LI, W. et al. CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p.65143-65151, 2017. <https://doi:10.18632/oncotarget.17821>

LINK, R. E. et al. Variation in prostate specific antigen results from 2 different assay platforms: Clinical impact on 2,304 patients undergoing prostate cancer screening. **Journal of Urology**, v. 171, n. 6 I, p. 2234–2238, 2004. <https://doi:10.1097/01.ju.0000127736.86597.e7>

MACHIDA, T. et al. MIR 1246 and MIR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. **Oncology Reports**, v. 36, n. 4, p. 2375-2381, 2016. <https://doi:10.3892/or.2016.5021>.

MADHAVAN, D. et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.146, n.1, p.163-74, 2014. <https://doi:10.1007/s10549-014-2946-2>.

MANDEL & METAIS. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. **CR Acad. Sci.**, v. 142, n.3, p. 241-243, 1948.

MANFREDI, M. A. et al. Increased incidence of urinary matrix metalloproteinases as predictors of disease in pediatric patients with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, n. 8, p.1091-1096, 2008. <https://doi:10.1002/ibd.20419>

MATSUMOTO, Y. et al. Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 36, n.5, 2535-2543, 2016. <https://doi: 10.3892/or.2016.5066>.

MITTRA, I. et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. **Journal of Biosciences**, v. 40, n. 1, p. 91-111, 2015. <https://doi: 10.1007/s12038-015-9508-6>.

MORELLO, M. et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 12, n. 22, p. 3526–36, 2013.

MOSES, M. A. et al. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. **Cancer Research**, v. 58, n. 7, p. 1395-1399, 1998.

MURALIDHARAN-CHARI, V. et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 10, p. 1603–1611, 2010. <https://doi: 10.1242/jcs.064386>.

NABESHIMA, K. et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology international**, v. 52, n. 4, p. 255–64, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2002.01343.x>.

NAITO, Y. et al. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 4, p. 697-713, 2017. <https://doi: 10.1007/s00018-016-2346-3>.

NAOR, D. et al. CD44 in cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 39, n. 6, p. 527-579, 2002.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 79, n. 4, p. 593–916, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>

OPITZ, C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 478, n. 7368, p. 197–203, 2011. <https://doi:10.1038/nature10491>.

OSTROWSKI, M. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nature cell biology**, v. 12, n. 1, p. 19–30, 2010. <https://doi:10.1038/ncb2000>.

PAN, B. T.; BLOSTEIN, R.; JOHNSTONE, R. M. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. **The Biochemical journal**, v. 210, n. 1, p. 37–47, 1983. <https://doi:10.1042/bj2100037>.

PERAKIS, S.; SPEICHER, M. R. Emerging concepts in liquid biopsies. **BMC Medicine**, v. 15, n. 75, p. 1-12, 2017. <https://doi:10.1186/s12916-017-0840-6>.

PITOT, H.C.; The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n.3, p. 962–970, 2006.

PLATTEN, M.; WICK, W.; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5435-5440, 2012. <https://doi:10.1158/0008-5472>.

POSTE, G.; NICOLSON, G. L. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 1, p. 399–403, 1980. <https://doi:10.1073/pnas.77.1.399>.

POTTER, V. R. Initiation and promotion in cancer formation: The importance of studies on intercellular communication. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 53, n. 5, p. 367–384, 1980.

PRENDERGAST, G. C. Cancer: Why tumours eat tryptophan. **Nature**, v. 478, n.

7368, p. 192–194, 2011. <https://doi.org/10.1038/478192a>.

PRENSNER, J. R. et al. The Long Non-Coding RNA PCAT-1 Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation through cMyc. **Neoplasia**, v. 16, n. 11, p. 900-908, 2014. <https://doi: 10.1016/j.neo.2014.09.001>.

PYO, S. W. et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.35, n. 1, p.1-9, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2006.11.004>.

RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n.2, 201-212, 2010. <https://doi: 10.1007/s10911-010-9177-x>.

RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013. <https:// doi: 10.1083/jcb.201211138>.

RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 847-856, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>.

RIGAU, M. et al. The present and future of prostate cancer urine biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12620 - 12649, 2013. <https://doi: 10.3390/ijms140612620>.

SABINE JAHR et al. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 4, p. 1659–1665, 2001.

SALEH, A. F. et al. Extracellular vesicles induce minimal hepatotoxicity and

immunogenicity. **Nanoscale**, v.11, n. 14, p. 6690-7001, 2019. <https://doi:10.1039/C8NR08720B>.

SETHI, S. et al. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. **American Journal of Translational Research**, v. 3, n.1, p. 90–99, 2011.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n.1, p.27-36, 2009. <https://doi: 10.1093/carcin/bgp220>.

SHI, D.; GU, W. Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. **Genes and Cancer**, v. 3, n.4, p. 240-248, 2012. <https://doi: 10.1177/1947601912455199>.

SLABÁKOVÁ, E. et al. Opposite regulation of MDM2 and MDMX expression in acquisition of mesenchymal phenotype in benign and cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 36156–36171, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5392>.

SPINDLER, K. L. G. et al. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 4, p. 1177-1185, 2012. <https://doi: 10.1158/1078-0432>.

STEWART, R. W. et al. Screening for prostate cancer. **Seminars in Oncology**, v.44, n.1, p.47-56, 2017.

TAKAI, E. et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. **Scientific Reports**, v. 5, p.1-10, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep18425>.

THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY. Cancer fact sheet. **World Health Organization**. [s.l: s.n.].

THÉRY, C. Cancer: Diagnosis by extracellular vesicles. **Nature**, v. 523, n. 7559, p.161-162, 2015. <https://doi: 10.1038/nature14626>.

THÉRY, C. 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**, v. 7, n. 1, p. 1-43, 2018. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

THIERRY, A. R. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. **Nature Medicine**, v. 20, n. 4, p. 430–435, 2014. <https://doi.org/10.1038/nm.3511>.

TRYGG, J.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics Techniques for Metabonomics. In: **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. [s.l: s.n.]. p. 171–199. https://doi: 10.1007/978-3-319-47656-8_7

UICC. Classificação de Tumores Malignos. [s.l: s.n.], 2004.

UKIMURA, O. et al. Contemporary role of systematic prostate biopsies: Indications, techniques, and implications for patient care. **European Urology**, 2013. <https://doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.033>.

UMEZU, T. et al. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. **Oncogene**, v. 32, n. 22, p. 2747-2755, 2013. <https://doi: 10.1038/onc.2012.295>

VAGNER, T. et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n.1, p. 1-16, 2018. <https://doi: 10.1080/20013078.2018.1505403>.

VALENTINO, A. et al. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: future biomarkers for prostate cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 19, n. 6, p. 651-657,

2017. <https://doi: 10.1007/s12094-016-1599-5>.

VAN DOORMAAL, F. F. et al. Cell-derived microvesicles and cancer. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 67, n. 7, p. 266-273, 2009.

VASIOUKHIN, V. et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. **British journal of haematology**, v. 86, n. 4, p. 774–779, 1994. <https://doi:10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x>.

VLAEMINCK-GUILLEM, V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management. **Frontiers in Oncology**, v.8, n. 222, p. 1-22, 2018. <https://doi:10.3389/fonc.2018.00222>.

VOLIK, S. et al. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. **Molecular Cancer Research**, v. 14, n. 10, p. 898–908, 2016. <https://doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0044>.

WADE, M.; LI, Y.-C.; WAHL, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 2, p. 83–96, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrc3430>.

WANG, B. G. et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. **Cancer research**, v. 63, n. 4, p. 3966-3968, 2003.

WANG, W. et al. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 43180–43191, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17858>.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.

XU, R. et al. Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements

in cancer care. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 10, p. 617-638, 2018. <https://doi: 10.1038/s41571-018-0036-9>.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015. <https://doi: 10.3402/jev.v4.27066>.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 617, p.1-25, 2000. <https://doi:10.3332/ecancer.2016.617>.

YOON, Y. J.; KIM, O. Y.; GHO, Y. S. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Reports**, v. 47, n. 10, p.531-539, 2014. <https://doi:10.5483/bmbrep.2014.47.10.164>.

YU, Q. R. Stem cells and cancer stem cells. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v. 11, n.15, p.2948-2951, 2007. <https://doi.org/10.15419/psc.v3i02.124>.

ZINKOVA, A. et al. Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02905-8>.

ZLOGORSKI-HURVITZ et al. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals. **Journal Cancer Res Clin Oncol**, v. 142, n. 1, p. 101-110, 2016. <https://doi: 10.1007/s00432-015-2005-3>.

ZÖLLER, M. CD44: Can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 4, p. 254-267, 2011. <https://doi: 10.1038/nrc3023>.


ANEXO

Artigo publicado relacionados ao tema da tese:

Anexo I: Extracellular vesicles as drivers of epithelial-mesenchymal transition and carcinogenic characteristics in normal prostate cells

RESEARCH ARTICLE

Extracellular vesicles as drivers of epithelial-mesenchymal transition and carcinogenic characteristics in normal prostate cells

Aline G. Souza¹  | Isaura Beatriz B. Silva¹ | Esther Campos-Fernández¹ |
Karina Marangoni¹ | Victor A. F. Bastos¹ | Patrícia T. Alves¹ |
Luiz R. Goulart^{1,2} | Vivian Alonso-Goulart¹

¹Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil

²Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California-Davis, Davis, California

Correspondence

Aline G. de Souza, Laboratório de Nanobiotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama, Bl. 2E, Sala 248, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.
Email: alingosouza@yahoo.com.br

There is increasing evidence that cancer dissemination and metastasis establishment may not only be due to the movement of tumor cells. Content of extracellular vesicles (EVs) secreted by tumor cells may also reflect the origin of these cells. Some molecules that constitute these EVs have already been used as targets for detection of specific tumors. However, to the best of our knowledge, EVs from biopsies and plasma have not yet been compared nor thoroughly investigated as triggers of malignant transformation and metastatic niche formation. To evaluate the role of EVs in the cellular microenvironment, we have treated the normal epithelial prostate cell lines, RWPE-1 and PNT-2, with a pool of EVs from biopsies of prostate primary tumors (bEVs), biopsies of benign prostate hyperplasia (hEVs), plasma of prostate cancer (PCa) patients (pEVs) or plasma of healthy individuals (pnEVs). Each of the four pools consisted of isolated EVs from several subjects, of which PCa patients were in different stages of cancer. Migration and proliferation profiles, cytokine release, and a panel of PCa-associated genes' expression of epithelial-mesenchymal transition in the cell lines were evaluated after 24 h incubation with EVs. When compared to the control groups, cells treated with the pool of EVs isolated from tumor biopsies and plasma of PCa patients showed greater migration and proliferation, significant alterations in gene expression, and high levels of IL-8, factors that are associated with cancer development. Specifically, isolated bEVs and pEVs may induce malignant features in non-tumor cells by activating several cellular events associated with cancer progression, suggesting that future PCa therapy may target multiple elements found in tumor-derived EVs.

KEYWORDS

carcinogenesis, epithelial-mesenchymal transition, malignant transformation, metastasis prostate cancer

Abbreviations: bEVs, EV from primary tumors; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; EV, extracellular vesicle; hEVs, EV from biopsies of benign prostate hyperplasia; PCa, prostate cancer; pEVs, EV from plasma of PCa patients; pnEVs, EV from plasma of healthy individuals.

1 | INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the most prevalent tumors amongst the male population.¹⁻² It is commonly characterized as a non-aggressive slowly progressing disease. However, it can progress to metastasis, affecting bones, liver, bladder, and seminal vesicles.³

PCa progression and metastasis are poorly understood, as are the roles of numerous factors in tumor microenvironment, which may contribute to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), one of the most common mechanisms of invasion and dispersion of cancer in the organism.⁴⁻⁵ Normally related to tissue repair procedures and embryogenesis, EMT has been investigated in cancer studies due not only to its ability to induce the development of mesenchymal phenotypes in tumor cells, causing loss of their adherence and polarity properties, but also due to the development of characteristics related to cancer stem cells, such as the ability to initiate, renew and disseminate the tumor.^{6,7}

The term extracellular vesicles (EVs) is employed to describe general membranous particles secreted by various types of cells, regardless of their origin and composition.^{8,9} EVs play an important role in cell-to-cell communication and signaling processes.⁸ The interaction between EVs and cells can be mediated by membrane contact and fusion or by endocytosis. In both cases, the content of EVs is released in the intracellular space of target cells.¹⁰ Their contents are highly heterogeneous, and may contain membrane and cytoplasmic components from the original cell, such as mRNA miRNA, DNA, lipids, and proteins.^{11,12} Therefore, EVs may play important roles in the interactions between cells, acting as modulators of the cellular microenvironment, by activating and altering the phenotype of target cells.^{13,14}

In prostate cancer, few studies have investigated the clinical significance of EVs isolated directly from biological samples. In this work, we reported the action of EVs isolated from PCa patients in the process of malignant transformation of non-malignant prostate cell lines. In addition, we evaluated differences in the size of EVs from different biological samples. Those findings may help us to identify key factors and components related to cancer development and better understand the tumor microenvironment and the processes of carcinogenesis and malignant transformation of healthy cells.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Two established human normal prostate epithelial cell lines were used: RWPE-1 and PNT-2. The RWPE-1 line was kindly donated by the University of Campinas (Unicamp-SP, Brazil), whereas and PNT-2 was purchased from the Rio de Janeiro cell bank (BCRJ, Duque de Caxias, Brazil). RWPE-1 cells were cultured in keratinocyte serum-free medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD) and 0.01% gentamicin. PNT-2 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 10% FBS and 0.01%

gentamicin. Cell lines were cultured at 37°C and 5% CO₂ until obtaining 80% confluence. Culture medium was changed once every 3 days.

2.2 | Sample preparation

All patient samples were acquired at the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia upon approval by the Research Ethics Committee under the number 562.678. All patients signed an informed consent.

Malignant tumor and benign prostate hyperplasia (BPH) tissue samples were obtained from ten and five patients, respectively. None of the PCa patients had received preoperative antitumor therapy. Biopsies from all sides of the malignant tumor and BPH were excised and embedded in phosphate-buffered saline (PBS). These samples were mechanically fragmented, washed twice with PBS in sterile conditions, and transferred to a cell culture flask (25 cm²) with 1 mL of EV-depleted FBS. EVs were removed from FBS by ultracentrifugation. After a 24 h culture, FBS was removed and 5 mL of RPMI medium supplemented with 10% EV-depleted FBS was added. After primary culture stabilization (50% confluence), conditioned medium was collected to isolate EVs every 48 h.

Blood was collected in EDTA tubes from 20 patients with PCa and 20 healthy individuals. Blood was centrifuged for 10 min at 1500g; plasma was collected and stored at -80°C. Clinical and laboratory parameters of all recruited individuals are shown in Table 1.

2.3 | Isolation and quantification of EV pool

Conditioned medium (50 mL) was collected from each of the ten primary culture biopsies of patients with PCa and five patients with BPH with approximately 80% confluence. Following the collection, samples were divided into two pools, according to their origin. The pools of conditioned medium of each origin were used to isolate the

TABLE 1 Patients' clinical parameters

Characteristics	Control (N = 25)	PCa patients (N = 30)
Mean age (range)	28 (18-44)	72.26 (55-92)
Gleason Score – N (%):		
6 (3 + 3)	-	14 (46.66)
7 (3 + 4)	-	04 (13.33)
7 (4 + 3)	-	05 (16.66)
8 (4 + 4)	-	03 (26.66)
9 (4 + 5 e 5 + 4)	-	04 (13.33)
Staging of PCa patients – N (%):		
T1	-	02 (6.66)
T2a	-	05 (16.66)
T2b	-	06 (20.00)
T3a	-	08 (26.66)
T4	-	09 (30.00)

EVs. Isolation of EVs from primary cell culture was conducted as described for the isolation of EVs from cell lines with some alterations.¹⁵ Each pool was subjected to centrifugation at 300g for 5 min, and then at 10 000g for 30 min to eliminate cells and debris. To obtain the EVs' fraction, conditioned medium pool was ultracentrifuged for 2 h at 100 000g, the supernatant was poured out, and the pellet was washed with 10 mL PBS. This procedure was repeated once, and the resulting pellet was resuspended in 100 μ L PBS. Pool of EVs of conditioned medium of primary cell culture biopsies will be referred as bEVs from PCa and hEVs from BPH.

Isolation of plasma EVs was conducted as described elsewhere, with minor alterations.¹⁶ Briefly, 1 mL of cell-free plasma of each patient was centrifuged at 2000g for 20 min at room temperature to remove debris. Samples were then divided into two pools, patients diagnosed with PCa and healthy individuals. The supernatant containing the partially clarified plasma pool was transferred to a new tube and five volumes of PBS was added. The plasma pool diluted in PBS was filtered through 0.22 μ m filters (Merck Millipore, Burlington, MA) to remove contaminating cells and cell debris. The filtered-follow-through was subjected to ultracentrifugation at 100 000g for 1 h. The pellet was washed with 10 mL PBS and ultracentrifuged at 100 000g for another 1 h. The final pellet was resuspended in 100 μ L PBS. EVs isolated from plasma pools will be referred as pEVs from PCa patients' plasma and as pnEVs from healthy individuals.

Protein concentration of EVs was determined by BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific) and 10 μ L of the EV suspension (2.5 μ g/ μ L) were used in all experiments.

2.4 | Scanning electron microscopy (SEM)

EVs samples were prepared according to protocol described elsewhere, with minor adjustments.¹⁷ Briefly, 5 μ L of glutaraldehyde 3.7% and 5 μ L of EVs samples were added to glass slides. After 15 min of incubation, slides were washed twice with PBS 1X, followed by

progressive dehydration in graded ethanol (40%, 60%, 80%, and 100%). Slides were kept at room temperature for 48 h to achieve complete dehydration. SEM analysis were performed at the Scanning Electron Microscopy Laboratory of the School of Chemical Engineering of the Federal University of Uberlandia (FEQUI-UFU).

2.5 | Immunofluorescence microscopy

EVs were labeled with the fluorescent dye Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific). Briefly, 125 μ g protein equivalents of isolated EVs were resuspended in 125 μ L of PBS and mixed with 5 μ L of Alexa Fluor 555 dye for 30 min. The mixture was diluted in 10 mL PBS and centrifuged at 100.000g for 1 h to pellet Alexa Fluor 555-labeled EVs. The pellet was washed twice with PBS and subjected to ultracentrifugation at 100.000g for 1 h. Finally, the EV pellet was resuspended in 100 μ L of PBS for immunofluorescence analysis of EVs. The RWPE-1 and PNT-2 cell lines were cultured in 24-well plates and incubated with labeled EVs for 12 h. Cells were extensively washed with PBS and fixed in glass slides with chilled acetone-methanol solution (50% v/v). Images were captured using EVOS FL Cell Imaging System® (Thermo Fisher Scientific) with the RFP Light Cube (λ_{ex} 531/40, λ_{em} 593/40) to detect fluorescence.

2.6 | qPCR

Total RNA for real-time quantitative PCR (qPCR) was extracted from RWPE-1 and PNT-2 cells treated with EVs or PBS using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific).

Synthesis of cDNA from total RNA (1 μ g) was performed using M-MLV Reverse Transcriptase kit according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific).

Reactions of reverse transcription were performed at 37°C for 60 min in a Mycycler thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time PCR was performed using Taqman® array plates

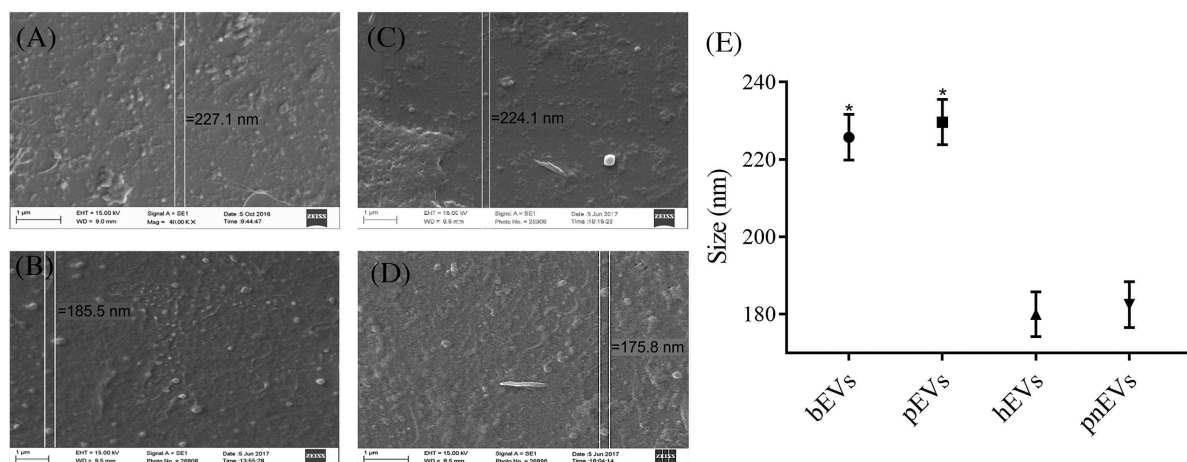


FIGURE 1 Characterization of the size of EVs by Scanning Electron Microscopy (SEM). A, Representative SEM images of EVs derived from biopsies of primary tumors (bEVs), B, biopsies of prostate benign hyperplasia (hEVs), C, from plasma (pEVs) of PCa patients and D, plasma of healthy individuals (pnEVs). E, The analysis showed the mean size of isolated EVs. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.001$

according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific) in a 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) to evaluate the expression levels of 48 PCa-related genes (Supplementary Table S1). Cycling conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), B2M (β -2-microglobulin), HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1) and GUSB (β -glucuronidase) were used as reference genes. The threshold fluorescence level was set manually for each plate using the software SDS (Applied Biosystems). Following the export of Cycle threshold (Ct) data, further data analysis was performed via the software DataAssist™ v3.01 Software (Applied Biosystems).

2.7 | Migration assay

RWPE-1 and PNT-2 cells (2×10^3) were seeded and cultured in a 12-well plate until confluence was reached. The cell layer was scratched with a sterile pipette tip to create a clear area and 25 μ g of EVs or 10 μ L PBS were added to the cultures. Cell migration was monitored by microscopy and images were taken at 0 and 24 h. Migration was quantified according to the clear area covered by the cells using the software Fiji-Image J (NIH, Bethesda, MD).¹⁸ Experiments were performed in triplicate.

2.8 | Proliferation assay

RWPE-1 and PNT-2 cells (2×10^3) were seeded in a 96-well plate, incubated overnight, and treated with 25 μ g of EVs or 10 μ L PBS. Cell proliferation was measured using the CytoSelect Cell Proliferation Assay Reagent according to the manufacturer's instructions (Cell Biolabs, San Diego, CA). Assay was performed in triplicate.

2.9 | Cytokine evaluation

The BD™ CBA Human Chemokine Kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was used to quantitatively measure interleukin-8 (IL-8) levels in supernatant samples of RWPE-1 and PNT-2 cell cultures after a 24 h treatment with EVs. Analyzes were carried out according to the manufacturer's instructions. All assays were conducted in triplicate.

2.10 | Statistical analysis

Data were analyzed using analysis of variance when appropriate. Bonferroni, Kruskal-Wallis test and Tukey corrections were applied in cases of multivariate comparisons, and differences were considered significant when the *P* value was <0.001. The statistical software package Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for analyzes.

3 | RESULTS

EVs' content may include different cellular components, such as nucleic acids, and proteins, which can influence various biological pathways in the recipient cells. The present study isolated four EV pools from four types of biological samples from several subjects to evaluate possible alterations caused by the EV pools in normal recipient cell lines. bEV and pEV pools were isolated from PCa patients in different stages, and were considered malignant EV pools, while hEVs, and pnEVs were considered normal EV pools and used respectively as controls.

To compare the size between malignant and normal EV pools, vesicles isolated by ultracentrifugation were fixed and observed by SEM. The EV pools isolated from biological samples showed variable

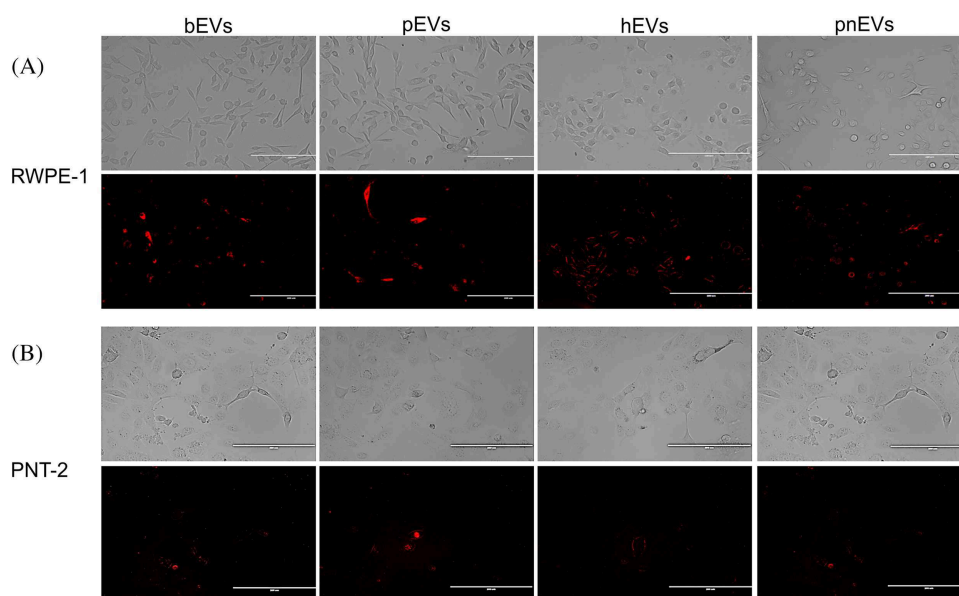


FIGURE 2 Internalization of exogenous EVs in normal prostate cells. Exogenous EVs previously labeled with Alexa fluor 555 (red) were identified intracellular after 12 h of treatment as demonstrated in RWPE'1 (A) and PNT'2 (B) cells by fluorescence microscopy. Scale bar: 200 μ m

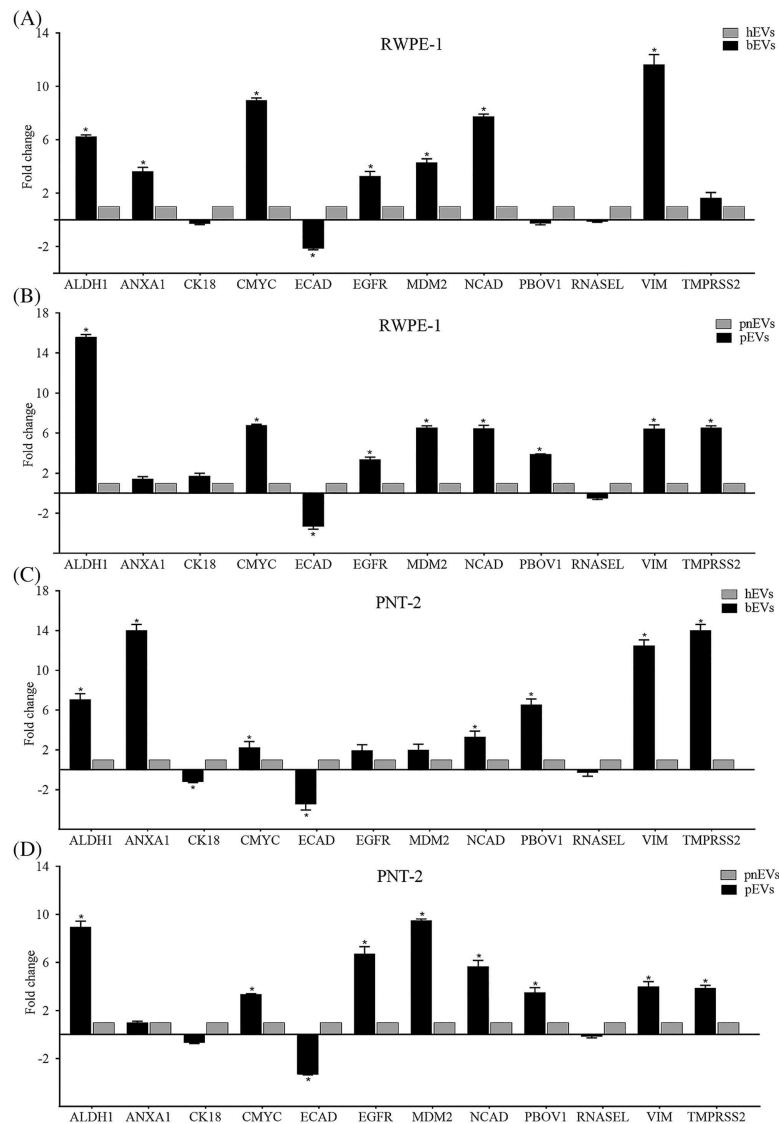


FIGURE 3 Changes in gene signatures associated with the tumor caused by the EVs treatment. A, RWPE-1 cell line treated with bEVs, calibrator hEVs. B, RWPE-1 cell line treated with pEVs, calibrator pnEVs. C, PNT-2 cell line treated with bEVs, calibrator hEVs. D, PNT-2 cell line treated with pEVs, calibrator pnEVs. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.001$ compared to the control group

sizes between 175 and 230 nm (Figure 1A). Interestingly, populations of bEVs and pEVs displayed larger sizes in comparison with those from control populations, hEVs and pnEVs. The mean sizes of bEVs and pEVs were 220–230 nm, whereas the mean sizes of hEVs and pnEVs were equal or less than 185 nm (Figure 1B).

To confirm the internalization of EVs in the normal prostate cell lines, EV pools were previously labeled with Alexa Fluor 555 dye. Internalization was observed after incubation with cell lines, in which both presented a fluorescent characteristic pattern, indicating that internalization of EVs within cells had occurred (Figure 2).

After internalization of EVs by cell lines, we investigated 48 important tumor-associated gene signatures. Of those, 12 genes showed alterations in their expression levels in bEVs and pEVs treated cells. RWPE-1 and PNT-2 cell lines had increased

expression of VIM and N-Cad genes, and downregulation of E-cad gene, after treatment with bEVs and pEVs, indicating a shift towards the EMT process. In addition, other genes, such as ALDH1, MDM2, c-MYC, EGFR, and TMPRSS2 were also overexpressed in both cell lines. The genes, ANXA1, PBOV1, RNASEL, and KRT18 did not present significant alterations in their expression profile, when compared to cells treated with hEVs and pnEVs (Figure 3). The expression of other analyzed genes (Supplementary Table S1) was not detectable by qPCR.

In addition to those genetic alterations, we also sought to verify whether EV pools could be altering proliferation, migration, and secretion of cytokines, since such changes are expected to occur in the EMT process of malignant transformation. Our findings showed that proliferation of RWPE-1 and PNT-2 increased significantly after bEVs and pEVs exposure, and PNT-2 cells proliferated more than RWPE-1

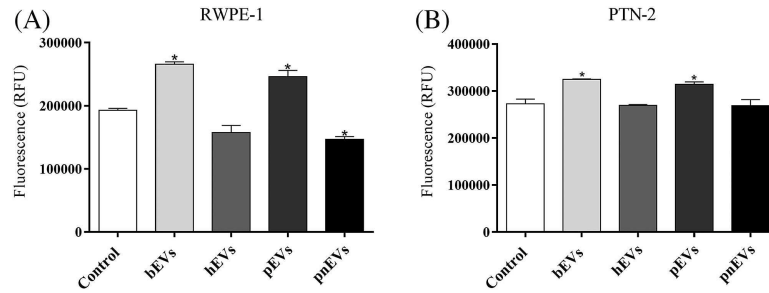


FIGURE 4 Evaluation of the influence of EVs treatment on proliferation. RWPE-1 (A) and PNT-2 (B) cell line was treated with bEVs, hEVs, pEVs and pnEVs. Only treatment with cancer EVs (bEVs and pEVs) has increased proliferation in normal cell lines which suggests that these EVs are collaborating with tumor transformation. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.001$ compared to the control group

for all types of treatments (Figures 4A and 4B). Under the same conditions, migration of both, RWPE-1 and PNT-2 cells, increased approximately 40% and 60% respectively, when treated with bEVs and pEVs (Figures 5A and 5B). IL-8 secretion was statistically significant ($P < 0.001$) only in RWPE-1 cell line, which showed increased levels of IL-8 after treatment with bEVs and pEVs when compared to hEVs, pnEVs, and non-treated cells (Figure 6A). On the other hand, IL-8 secretion profile in PNT-2 cells treated with EVs did not exhibited alterations when compared to non-treated cells; although, significant alterations were observed when comparing bEVs and hEVs treatments (Figure 6B).

4 | DISCUSSION

Various components present in the cancer microenvironment, secreted by stromal cells, are able to activate signaling pathways involved in carcinogenesis and EMT.^{19,20} EVs can promote important alterations related to tumor establishment.^{21,22} In addition to acting in cellular communication, EVs can also be used for diagnosis of diseases based on their size and content. Previous studies have shown that cancer cells are prone to release more and larger vesicles,^{13,23} known as large oncosomes.²⁴ This may be explained by the accelerated metabolism of cancer cells.²⁵ In our work, we demonstrate that the EV

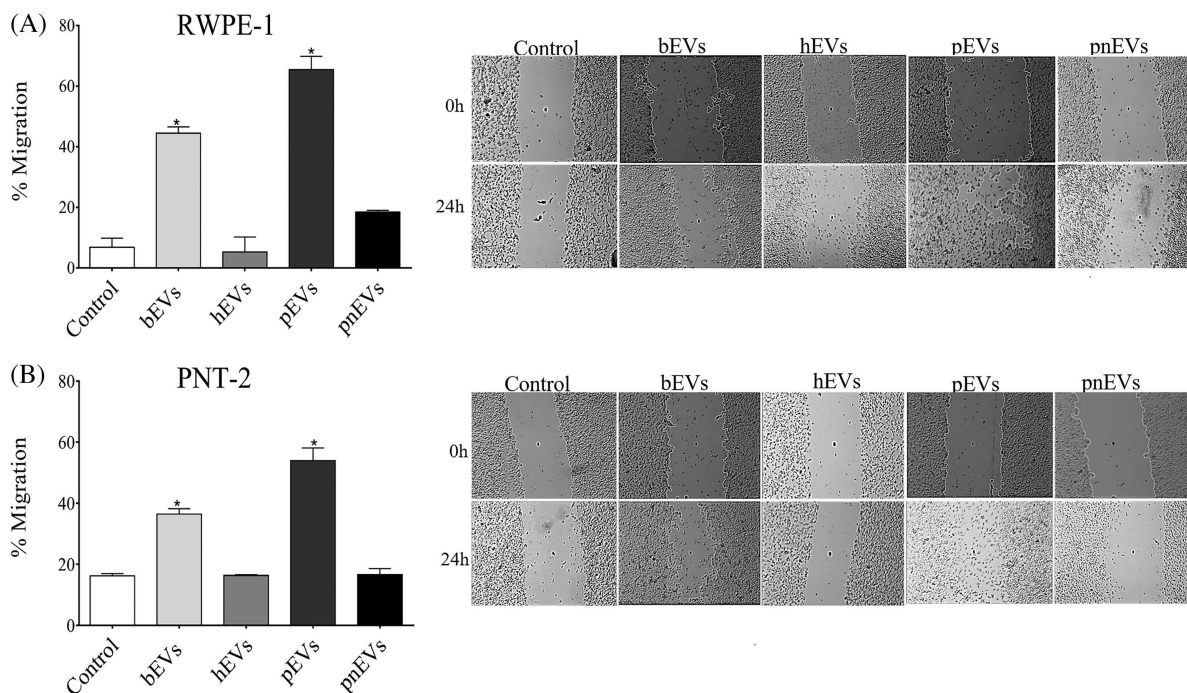


FIGURE 5 Evaluation of the influence of EVs treatment on migration. RWPE-1 (A) and PNT-2 (B) cell line was treated with bEVs, hEVs, pEVs and pnEVs. After 24 h of treatment the cancerous EVs induced a greater capacity of migration in the normal cells, being the vesicles obtained from the plasma more efficient (pEVs). On the right, representative images of the migration assay at 0 h (above) and 24 h (below). Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.001$ compared to the control group

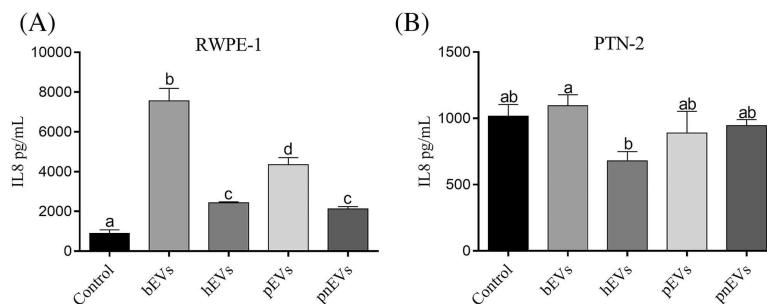


FIGURE 6 IL-8 secretion profiles of treated RWPE-1 and PNT-2 cells: IL-8 levels secreted by RWPE-1 (A) and PNT-2 (B) were evaluated after treatment with bEVs, hEVs, pEVs, and pnEVs. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. $P < 0.001$ compared to the control group. Means with different letters are significantly different

pools isolated from PCa patients are larger than those from controls (hEV and pnEV pools). Vesicle size may also be associated with the quantity of molecules inside those vesicles. In this plethora of molecules, potential biomarkers can be identified and used for PCa diagnosis and prognosis.

The mechanism by which EVs act to modulate the tumor microenvironment are not yet fully understood.²⁶ Recent studies demonstrate that the biological content of EVs is highly variable.²⁷ This fact corroborates with the hypothesis that EVs isolated from different sources can induce different responses in recipient cells. Molecules such as mRNA, miRNA, DNA, lipids, and proteins found within EVs have been identified as functional after being internalized by recipient cells.^{13,28} Therefore, mRNAs transported by EVs can be translated, altering the proteomic profile of the target cell. Furthermore, miRNA transported by EVs may also play important roles in the proteomic signature, since they modulate biological events at the transcriptional and post-transcriptional levels. Even small changes caused by those molecules are known to affect cell proliferation, apoptosis, cell differentiation, and the cell-cycle regulation; explaining why EVs are of crucial importance in the carcinogenic process and in the EMT pathway.^{13,29}

EMT is strongly associated with the metastatic process and acquisition of similar stem-cell properties by tumor cells, which are thus termed cancer stem cell (CSC).¹⁸ Herein, we have demonstrated that bEV and pEV pools caused important alterations in the expression profiles of genes related to carcinogenesis, EMT and totipotency of normal cells. We have shown that expression levels of VIM, N-cad, and E-cad genes, recognized by their exclusive role in EMT, aid in the development of a mesenchymal phenotype by normal cells. Those cells have usually shown higher resistance to apoptosis and elevated production of ECM components, as well as increased cellular migration and invasion, as shown by Rahman et al,¹⁶ which corroborate our findings.

Several reports demonstrate that overexpression of genes, such as VIM, N-cad,¹⁶ EGFR,^{30–33} MDM2,³⁴ c-MYC,³⁵ ALDH1,³⁶ and TMPRSS2³⁷ are involved in the carcinogenesis process and later stages of PCa. Important to emphasize that EGFR, MDM2, TMPRSS2, and c-MYC were overexpressed in the present work. This may be explained by the association of such genes with the upregulation of transcriptional factors, degradation of EMT suppressor proteins in PCa,³⁸ increased cellular proliferation, p53 degradation, and high

tumor volume.^{20,34,39} Therefore, the increased cellular migration and proliferation may be a response to the genetic alterations suffered by cells after the treatment with EV pools derived from PCa patients.

The mechanisms that drive carcinogenesis in normal cells are yet to be fully understood. However, our results demonstrate the ability of cancer-derived EV pools to alter the expression of oncogenes, favor EMT and trigger metastatic processes. We also demonstrated that EVs isolated from PCa patients (bEVs or pEVs) had a similar action on non-malignant recipient cells (RWPE-1 and PNT-2), suggesting that these EVs may contain a similar cargo, and both have been released by cancer cells. It also suggests that EVs can spread to distant sites through the

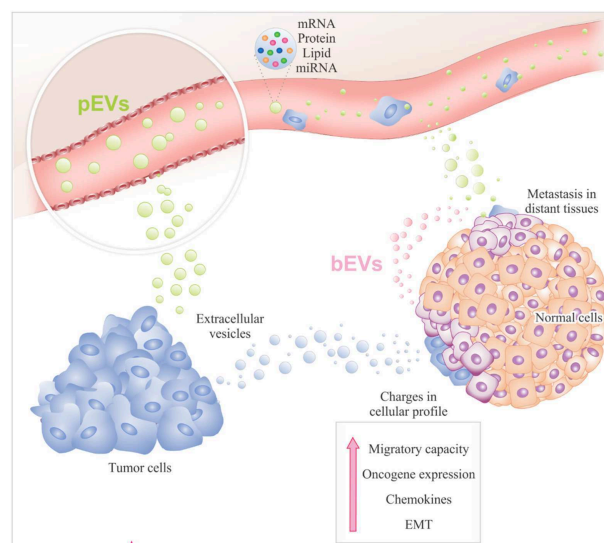


FIGURE 7 Representative model of malignant transformation process caused by EVs derived from tumor cells. Release of EVs containing mRNA, miRNA, DNA, proteins, and lipids. EVs can access the blood vessel and be delivered to other organs and can be internalized by healthy cell near the tumor site. Thus, can promote malignant transformation of healthy cells in multiple organs. Healthy cells undergo biological alterations promoted by EV contents. Tumor features characterized by increased migratory capacity, oncogenes' and EMT gene expression, high proliferation rates, and high levels of specific cytokines

bloodstream promoting the development and establishment of metastasis, as represented in Figure 7.

Our study confirmed that gene expression, migration and proliferation were strongly altered in non-malignant cell lines cultured in vitro after exposure to bEVs and pEVs. Briefly, our data highlight the critical role of EVs from cancer cells samples in the carcinogenic process and progression of prostate cancer, and suggest that these EVs and their molecules are potential therapeutic targets for future cancer treatments. However, our results are limited by the use of EVs pools from several PCa patients with different cancer stages. Therefore, to complement our findings, future studies should focus on the isolation of PCa EV from individual subjects to enable the correlation of PCa patients' staging with their effect on EMT in normal prostate cell lines.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian funding agencies, CAPES, FAPEMIG, and CNPq, which supported the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology. The authors would also like to thank patients and urologists of the Clinics' Hospital of the Federal University of Uberlândia, and the technical support for the SEM analysis of researchers at the Scanning Electron Microscopy Laboratory of the School of Chemical Engineering at the Federal University of Uberlândia (FEQUI-UFU). Special thanks to the PhD student, Paula Brígido, from the Federal University of Uberlândia for her valuable collaboration in figures of this article.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Aline G. Souza  <http://orcid.org/0000-0001-7251-7285>

REFERENCES

- Attard G, Parker C, Eeles RA, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016;387:70–82.
- Scarpato KR, Albertsen PC. Prostate cancer. *Pros Cancer*. 2016;9:111–116.
- Silva M, Melo SA. Non-coding RNAs in exosomes: new players in cancer biology. *Curr Genomics*. 2015;16:295–303.
- Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. MYC and prostate cancer. *Gen Cancer*. 2010;1:617–628.
- Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*. 2011;71:5346–5356.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105–111.
- de Souza AG, Bastos VAF, Silva IBB, Marangoni K, Goulart VA. Different gene therapy strategies: a overview for prostate cancer. *Curr Gene Ther*. 2016;16:1–5.
- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neuro-Oncol*. 2013;113:1–11.
- Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol*. 2012;181:1573–1584.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200:373–383.
- Lopatina T, Gai C, Deregibus MC, Kholia S, Camussi G. Cross talk between cancer and mesenchymal stem cells through extracellular vesicles carrying nucleic acids. *Front Oncol*. 2016;6:125.
- Cai J, Wu G, Jose PA, Zeng C. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp Cell Res*. 2016;349:179–183.
- Verma M, Lam TK, Hebert E, Divi RL. Extracellular vesicles: potential applications in cancer diagnosis, prognosis, and epidemiology. *BMC Clin Pathol*. 2015;15:6.
- Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*. 2016;164:1226–1232.
- Lobb RJ, Becker M, Wen SW, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27031.
- Rahman MA, Barger JF, Lovat F, Gao M, Otterson GA, Nana-Sinkam P. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016;7:54852–54866.
- Sokolova V, Ludwig A-K, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;87:146–150.
- Rasband WS. ImageJ: optical density calibration. *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*. Available at: 2017; <http://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>.
- Craene BDe, Bex G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:97–110.
- Slabáková E, Kharashvili G, Smějová M, et al. Opposite regulation of MDM2 and MDMX expression in acquisition of mesenchymal phenotype in benign and cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6:36156–36171.
- Shifrin DA, Jr., Demory Beckler M, Coffey RJ, Tyska MJ. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Mol Biol Cell*. 2013;24:1253–1259.
- Webber J, Yeung V, Clayton A. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin Cell and Dev Biol*. 2015;40:27–34.
- Ciardillo C, Cavallini L, Spinelli C, et al. Focus on extracellular vesicles: new frontiers of cell-to-Cell communication in cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17:175.
- Meehan B, Rak J, Vizio DDi. Oncosomes – large and small: what are they, where they came from. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:33109.
- Kamphorst JJ, Gottlieb E. Cancer metabolism: friendly neighbours feed tumour cells. *Nature*. 2016;536:401–402.
- Van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med*. 2009;67:266–273.
- Kreger BT, Dougherty AL, Greene KS, Cerione RA, Antonyak MA. Microvesicle cargo and function changes upon the induction of cellular transformation. *J Biol Chem*. 2016; <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725705>.
- Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, et al. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J Extracell Vesicles*. 2016;1:1–10.
- Zeringer E, Li M, Barta T, Schageman J. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol*. 2013;3:11–18.
- Kowalik A, Kowalewska M, Gózdź S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. *Transl Res*. 2017;185:58–84.

31. Martin A, Cano A. Tumorigenesis: twist1 links EMT to self-renewal. *Nat Cell Biol.* 2010;12:924–925.
32. Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res.* 2011;71:3268–3277.
33. Nicholson R, Gee JM, Harper M. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;37:9–15.
34. Leite KR, Franco MF, Srougi M, et al. Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma. *Mod Pathol.* 2001;14:428–436.
35. Hawksworth D, Ravindranath L, Chen Y, et al. Overexpression of C-MYC oncogene in prostate cancer predicts biochemical recurrence. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13:311–315.
36. Van Den Hoogen C, Van Der Horst G, Cheung H, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2010;70:5163–5173.
37. Leyten GHJM, Hessels D, Jannink SA, et al. Prospective multi-centre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;65:534–542.
38. Liu L, Wang LL, Yu XG, Lin F. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2013;19:360–364.
39. Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX, and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:83–96.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Souza AG, B. Silva IB, Campos-Fernández E, et al. Extracellular vesicles as drivers of epithelial-mesenchymal transition and carcinogenic characteristics in normal prostate cells. *Molecular Carcinogenesis.* 2017;1–9.

<https://doi.org/10.1002/mc.22775>