

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Exossomos como método de detecção de
resistência adquirida ao tratamento de melanoma**

Lucas Goedert

Pelotas, 2014.

LUCAS GOEDERT

**Exossomos como método de detecção de resistência adquirida ao
tratamento de melanoma**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Veiras Collares.
Orientador de Estágio: Prof. Dr. Richard Koya.

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G594e Goedert, Lucas

Exossomos como método de detecção de resistência adquirida ao tratamento de melanoma / Lucas Goedert. – 64f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Tiago Veiras Collares.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Priscila Marques Moura de Leon, Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Helena Strelow Thurow, Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares, Universidade Federal de Pelotas (orientador).

A todos que me apoiaram e incentivaram ao longo dessa jornada.

Nós conseguimos.

A todas as famílias acometidas pelo câncer.

Nós conseguiremos.

Agradecimentos

A Deus por todos os ensinamentos e força durante toda minha vida.

Aos meus pais, Carlos e Lúcia, fonte de eterno incentivo, apoio e amor. Abdicaram dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

A minha família por sempre terem torcido por mim, compreendido minha ausência e compartilhando a minha saudade.

A minha namorada Jessica, pela companhia e amor incessantes em todas as conquistas e em todos os sonhos, pela amizade plena e sincera. Meu porto seguro.

Aos meus padrinhos, Liberto e Maria da Penha, e meus avós Francisco e Maria, por todas as boas lembranças e por terem compartilhado dos meus sonhos.

Aos meus amigos, distantes e presentes, por todos os momentos de alegria.

Ao Professor Dr. Tiago Collares, por ter despertado e fomentado a minha paixão pela ciência.

Aos meus orientadores da UCLA, Professor Dr. Antoni Ribas, Professor Dr. Richard Koya e Professora Dra. Siwen Hu-likeskovan, por todos os aprendizados.

À Professora e amiga Luciana, pelo belo exemplo de conduta profissional e trabalho em grupo e por compartilhar as nossas vitórias.

A todo grupo GPO, pelos ensinamentos e conquistas.

Ao Professor Luciano, pelo apoio acadêmico e administrativo nessa jornada.

Ao Centro de Biotecnologia, junto a todos seus profissionais e colegas, pela companhia e ajuda durante a minha graduação.

Muito Obrigado!

"O que fazemos por nós mesmos morre conosco. O que fazemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal."

(Albert Pine)

Resumo

GOEDERT, Lucas. **Exossomos como método de detecção de resistência adquirida ao tratamento de melanoma**. 2014. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O melanoma é um tipo de câncer que surge a partir dos melanócitos e constitui uma doença altamente agressiva e que apresenta elevados índices de mortalidade. Sua etiologia mais comum, uma mutação ativadora constitutiva no códon 600 da proteína BRAF, compõe o principal alvo terapêutico no tratamento da doença, especialmente em estágios metastáticos. A eficiência inicial dos inibidores de BRAF mutado levando a uma remissão considerável do tamanho do tumor, é substituída, geralmente após 8 meses de tratamento, pela progressão tumoral após o aparecimento da resistência adquirida à terapia. Diversas abordagens estão surgindo para a reversão da resistência adquirida a fim de obter a remissão completa do tumor de pacientes com melanoma, entretanto faz-se necessária a identificação precoce do tipo de mecanismo de resistência que está emergindo. A detecção precoce do mecanismo de resistência permitirá o direcionamento do paciente para a melhor abordagem para a continuação da terapia no combate ao câncer. A detecção precoce, entretanto, é uma tarefa laboriosa, especialmente em estágio avançados da doença onde há inúmeros nichos metastáticos, os quais podem desenvolver mecanismos de resistências distintos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi validar a utilização do exossomos como um possível método de detecção precoce de aquisição de resistência ao tratamento do melanoma. A análise proteica dos exossomos, permitiu identificar, *in vitro*, alterações do perfil de expressão de proteínas envolvidas na aquisição de resistência a inibidores de BRAF mutado. Foi possível observar que células resistentes ao fármaco Vemurafenibe apresentaram expressão elevada de PDGFR-B, responsável por um dos mecanismos existentes de resistência, em comparação com linhagens sensíveis. Os resultados obtidos, necessitam de confirmação *in vivo*, entretanto demonstram ser uma ferramenta aplicável na detecção precoce de resistência adquirida.

Palavras-chave: diagnóstico exossomal; resistência adquirida; melanoma.

Abstract

GOEDERT, Lucas. **Exosomes as a detection method of acquired resistance to treatment of melanoma**. 2014. 64f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Melanoma is a type of cancer that arises from melanocytes and is a highly aggressive disease and has elevated mortality rates. Its most common ethiology, a constitutive activating mutation in codon 600 of the BRAF protein, composes the main therapeutic target in the treatment of this disease, especially in metastatic stages. The initial efficiency of mutated BRAF inhibitors leading to a considerable remission of tumor size is replaced, usually after 8 months of treatment, by tumor progression after the appearance of acquired resistance to the therapy. Several approaches are emerging to reverse acquired resistance in order to obtain complete tumor remission in patients with melanoma, however it is necessary to identify early the type of resistance mechanism that is emerging. Early detection of resistance mechanism will enable the direction of the patient to the best approach for continuing therapy against the cancer. Early detection, however, is a laborious task, especially in advanced stages of the disease where there are numerous metastatic niches, which can develop into distinct mechanisms of resistance. Thus, the aim of this study was to validate the use of exosomes as a possible method of early detection of acquired resistance to treatment of melanoma. The protein analysis of exosomes allowed the detection, *in vitro*, of changes in the expression of proteins involved in the acquisition of resistance to mutated BRAF inhibitors. It was observed that Vemurafenib resistant cells showed high expression of PDGFR-B, responsible for one of the existing resistance mechanisms, compared with sensitive lines. The obtained results need to be confirmed *in vivo*, however it demonstrate's to be an applicable tool in the early detection of acquired resistance.

Key-words: Exossomal diagnosis; acquired resistance; melanoma.

Lista de Figuras

Figura 1 - Cascata de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK.	24
Figura 2 – Cascata de sinalização RAF-MEK-ERK constantemente ativada por BRAF mutado.	28
Figura 3 – Mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF.....	34
Figura 4 - Imagem da Microscopia Eletrônica confirmando o isolamento dos exossomos utilizando o protocolo otimizado para biofluidos.....	45
Figura 5 - Citometria de Fluxo confirmando que 99,1% dos exossomos são positivos para CD63.	46
Figura 6 - Coloração por Coomassie Blue. Foram aplicados 15µg de proteínas. M (marcador), Cell (célula) e Exos (exossomos).	47
Figura 7 - Western Blot.....	48

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AKT	Proteína Quinase B
ARAF	Proteína Serina/ Treonina ARAF
ATP	Adenosina Trifosfato
BCL-2	Célula B de Linfoma 2
BIM	Proteína da Família da BCL-2
BRAF	Proteína Serina/ Treonina BRAF
CAV-1	Caveolina 1
CD63	Tetrasparina 63
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CDK4	Ciclina Dependente de Quinase 4
CDK6	Ciclina Dependente de Quinase 6
CDKN2A	Inibidor 2 A de Quinase Dependente de Ciclina
C-KIT	Receptor de Tirosina Quinase Tipo III

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COT	Oncogene de Câncer de Tireóide
CRAF	Proteína Serina/ Treonina CRAF
DEX	Exossomos Derivados de Células Dendríticas Autólogas
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2F	Fator de Transcrição 2
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FBS	Soro Fetal Bovino
G1	Estágio 1 do Ciclo Celular
GAPDH	Gliceraldeído-3 Fosfato Desidrogenase
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
HDM2	Proteína Minuto Duplo Humano 2
HIF-1 α	Fator 1 α de Hipóxia Induzida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRAS	Proteína Sarcoma de Rato de Harvey
IGF-1R	Receptor de Crescimento Semelhante à Insulina 1
ILVs	Vesículas Intraluminais

INCA	Instituto Nacional de Câncer
KDa	Quilo daltons
Ki-67	Antígeno Identificado pelo Anticorpo Monoclonal Ki-67
KIT	Proteína Tirosina Quinase
KRAS	Proteína Sarcoma de Rato de Kirsten
MAGE3	Antígeno de Melanoma 3
MAP3K8	Sinônimo de COT
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MART-1	Proteína Antígeno Melanoma Reconhecido por Célula T
MDM2	Proteína Minuto Duplo Murino 2
MEK	Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno
MHC	Complexo de Imunocompatibilidade
min	Minuto
mL	Microlitros
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
MVBs	Corpos Multivesiculares
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NKG2D	Receptor de Célula <i>Natural Killer</i> Grupo 2
nm	Nanômetros
NRAS	Proteína Sarcoma de Rato identificada em

	Neuroblastoma
°C	Graus <i>Celsius</i>
p14 ^{ARF}	Produto de Leitura Alternativa de CDKN2A
p16 ^{INKA}	Proteína Inibidora de Ciclina Dependente de Quinase 4
p21	Proteína Reguladora de Transição em G1
p27 ^{KIP1}	Inibidor de Ciclina Dependente de Quinase 1B
p38	MAPK p38
p53	Proteína Celular Supressora de Tumor
PCA-3	Antígeno de Câncer de Prostata
PDGFR-B	Receptor do Fator de Crescimento de Plaquetas B
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 Quinase
PLX4032	Vemurafenibe
pRB	Proteína de Retinoblastoma
PRKD3	Proteína Quinase D3
PSF	Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B
PTEN	Proteína Homóloga de Fosfatase e Tensina
Q61K	Troca de Glutamina por Lisina no Códon 61
Q61R	Troca de Glutamina por Arginina no Códon 61
RAS	Proteína Sarcoma de Rato
RECIST	Critério de Avaliação de Tumor Sólido
RNA	Ácido Ribonucleico

RTK	Receptor de Tirosina Quinase
S	Estágio de Duplicação do DNA no Ciclo Celular
TGN	Trans-golgi
UV	Ultravioleta
V600E	Mutação no Códon 600 por troca de Valina por Ácido Glutâmico
V600K	Mutação no Códon 600 por Troca de Valina por Lisina
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor Fator de Crescimento Endotelial Vascular
A	Alpha
α -MHS	Hormônio Estimulante de Alpha-melanocortina
B	Beta

SUMÁRIO

1	Introdução Geral.....	18
2	Objetivos	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	Revisão Bibliográfica	20
3.1	Melanoma.....	20
3.2	Incidência	21
3.3	Fatores de Risco	22
3.4	Via de Sinalização das MAPKs no Melanoma.....	23
3.5	Principais Etiologias	24
3.5.1	Mutações em CDKN2A	24
3.5.2	Mutações em NRAS	25
3.5.3	Mutações em BRAF	26
3.6	Inibidores de BRAF mutado	28
3.6.1	Sorafenibe	28
3.6.2	Vemurafenibe	29
3.6.3	Dabrafenibe	29
3.7	Mecanismos de Resistência aos inibidores de BRAF	30
3.8	Exossomos.....	34
3.8.1	Biogênese Exossomal	36

3.8.2 Aplicações Biotecnológicas dos Exossomos.....	36
4 Metodologia.....	38
4.1 Cultivo de Células	38
4.2 Isolamento dos Exossomos.....	38
4.3 Microscopia Eletrônica	39
4.4 Citometria de Fluxo	40
4.5 Extração e Determinação de Concentração Proteica.....	41
4.6 SDS –Page, Coomassie Blue e Western Blot	42
5 Resultados e Discussão	44
6 Considerações Finais.....	51
Referências	52

1. Introdução Geral

Em virtude do meu interesse em oncologia e da carta de aceite do Dr. Antoni Ribas da Universidade da Califórnia Los Angeles (UCLA), Estados Unidos, e com a contemplação da Bolsa de Graduação Sanduíche do Programa Ciência Sem Fronteiras concebida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pude realizar o meu Estágio Obrigatório e o Trabalho de Conclusão de Curso no *Jonsson Comprehensive Cancer Center*. Como Vice-Presidente da Sociedade Internacional de Melanoma, o Dr. Ribas tem como linhas de pesquisa em seu laboratório métodos de imunoterapia para o tratamento de melanoma e métodos para a reversão e identificação de resistência adquirida a quimioterápicos e fármacos alvo-direcionados contra o melanoma.

Durante essa oportunidade de realizar estágio no exterior tive a possibilidade de participar de diversas palestras e congressos na área de melanoma onde é perceptível uma crescente demanda para a detecção precoce dos tipos de resistência adquirida ao tratamento de melanoma, aquela que ocorre depois da administração do fármaco.

Nesse sentido, o projeto de pesquisa do qual participei conjuntamente com o Professor Dr. Richard Koya e a Dra. Siwen Hu-Lieskovan, constitui uma nova linha de pesquisa no laboratório do Dr. Ribas visando criar um método capaz de identificar precocemente qual mecanismo de resistência adquirida está emergindo durante o tratamento de melanoma, o qual, futuramente, possibilitará o direcionamento do paciente para terapias alternativas. Dessa maneira, a monografia apresentada neste trabalho abordará os resultados iniciais, *in vitro*, obtidos durante a avaliação dos exossomos como potencial ferramenta para a detecção de resistência adquirida ao tratamento de melanoma utilizando fármacos alvo-direcionados contra a proteína mutante V600E BRAF, presente em cerca de 60% dos casos de melanoma cutâneo e considerado sua principal etiologia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Validar os exossomos como potencial ferramenta para a detecção precoce do tipo de mecanismo de resistência adquirida ao tratamento de melanoma alvo-específico contra o BRAF V600E/K em linhagens celulares *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a expressão de proteínas envolvidas na aquisição de resistência ao tratamento de melanoma pode ser detectada nos exossomos derivados de melanoma;
- Verificar se a expressão diferencial dessas proteínas pode ser detectada em exossomos de linhagens sensíveis e resistentes ao tratamento de melanoma utilizando o fármaco Vemurafenibe.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Melanoma

Melanoma é um tipo de câncer que surge a partir da transformação maligna de melanócitos, os quais são as células produtoras de pigmentos responsáveis pela cor da pele (BANDARCHI et al., 2013). As principais causas que levam à transformação maligna de melanócitos ainda não foram totalmente esclarecidas, mas são multifatoriais e incluem os danos da radiação UV e suscetibilidade genética (SHENENBERGER, 2012). Dentre os tipos mais comuns de melanoma estão o Melanoma de Mucosa que pode ocorrer em qualquer mucosa do corpo, incluindo vias nasais, garganta, vagina, ânus ou boca; Melanoma Uveal, também conhecido como Melanoma Ocular, é a forma desse câncer que ocorre nos olhos; e o Melanoma Cutâneo que é o câncer que ocorre na pele, sendo esse mais comum (HURST; HARBOUR; CORNELIUS, 2003). Como a pele é o órgão que detém o maior número de células pigmentadas, o Melanoma Maligno Cutâneo é o tipo de melanoma de maior incidência e corresponde a 5% de todos os tipos de câncer de pele, constituindo o câncer mais letal dentre esses, portanto, será o mais abordado nesse trabalho (SHENENBERGER, 2012).

O melanoma maligno é caracterizado por ser um câncer de baixa incidência, porém de alta mortalidade, devido sua grande capacidade metastática e resistência aos tratamentos disponíveis (SOENGAS; LOWE, 2003). Apesar de um número expressivo de ensaios clínicos para testar uma grande variedade de estratégias anti-melanoma, que vão desde a cirurgia à imunoterapia, radioterapia e quimioterapia, a taxa média de sobrevivência ainda é de 6 a 10 meses (JEMAL et al., 2002). O tratamento que apresenta maiores taxas de sucesso é a cirurgia, a qual é recomendada quando o câncer é detectado em estágios iniciais, apresentando baixas taxas de recorrência (UONG; ZON, 2010).

A progressão do melanoma é dividida em 5 estágios e determina qual abordagem terapêutica será aplicada (LEE et al., 2013). No estágio 0, também chamada de melanoma *in situ*, melanócitos anormais são encontrados na epiderme, podendo originar um câncer e se espalhar para tecidos normais. O estágio I do melanoma está dividido em duas fases, onde na fase IA, o tumor não é maior do que um milímetro de espessura e não apresenta ulceração, enquanto na fase IB, o tumor é menor que 1 milímetro de espessura, mas apresenta ulceração ou ele não apresenta ulceração, porém é maior que 1 milímetro. O estágio II do melanoma é caracterizado por um tumor de tamanho em torno de 4 milímetros, podendo apresentar ulcerações ou não. O estágio III do melanoma é caracterizado por metástase em um ou mais linfonodos, enquanto no estágio IV há a presença de vários nichos metastáticos em outros órgãos (NCI, 2013).

Os tratamentos mais recentes recomendados para os estágios III e IV são aqueles que utilizam drogas alvo-direcionadas (por exemplo, inibidores de BRAF mutado), as quais apresentam resposta rápida e eficiente, levando a uma remissão expressiva do tumor, mas que, na grande maioria dos casos, deixam de atuar quando mecanismos de resistências emergem após alguns meses de tratamento, permitindo a reincidência do tumor (FEDORENKO et al., 2011).

3.2 Incidência

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o melanoma cutâneo tem predominância em adultos brancos e corresponde a 4% dos cânceres de pele, enquanto o câncer de pele no geral representa 25% dos cânceres da população brasileira. A última atualização de dados do INCA, identificou 1.507 mortes por melanoma em 2010, sendo 842 homens e 665 mulheres. A estimativa para a incidência de novos casos para o ano de 2012 foi de 6.230, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres (INCA, 2013).

As maiores incidências e prevalências de melanoma cutâneo já registradas em território brasileiro foram encontradas na região oeste de Santa Catarina, sendo

mais elevadas do que aquelas encontradas em outras partes do país e estão acima das estimativas proposta pelo INCA, sendo representadas por 12.2 casos por 100.000 habitantes no ano de 2008 (MORENO et al., 2012). Este fato é mais provável devido às características fenotípicas da população que é composta principalmente por descendência europeia e também pode ser relacionada à contínua exposição à radiação UV, devido a sua localização no sul do Brasil, onde há maior incidência desse tipo de radiação (MORENO et al., 2012).

No contexto global o melanoma maligno é o 19º tipo de câncer mais comum, com estimativa de ser responsável por cerca de 200.000 novos casos de câncer em 2008 (mais de 1% do total), sendo responsável por 75% das mortes relacionadas à neoplasias cutâneas (SCHMERLING et al., 2011). O aumento das taxas de incidência de melanoma cutâneo foi observado durante as últimas quatro décadas em populações brancas em todo o mundo. As estatísticas de câncer nos Estados Unidos revelaram aumento de três vezes nas taxas de incidência entre 1970 e 2000. As taxas de incidência na Europa são muito semelhantes as dos Estados Unidos e indicam que a tendência de aumento das taxas de incidência continuará no futuro, pelo menos nas próximas duas décadas, quando, uma duplicação das taxas de incidência adicional é esperado (GRANT-KELS et al., 2009).

3.3 Fatores de Risco

Embora diversos estudos tenham sido direcionados para revelar quais mecanismos são necessários para a malignização dos melanócitos, muito ainda permanece desconhecido (SHENENBERGER, 2012). Entretanto sabe-se que existem vários fatores de risco endógenos e exógenos (ambientais) associados ao desenvolvimento do melanoma maligno, entre eles histórico prévio de melanoma no paciente, histórico familiar de melanoma e *nevus* displásicos ou benignos múltiplos revelam a associação mais forte (BANDARCHI et al., 2010). Outros fatores de risco incluem: exposição solar de longo prazo (provavelmente exposição intermitente), exposição aos raios ultravioleta, ter cabelo ruivo ou loiro, pele pálida, grandes *nevus*

congenitos, imunossupressão, cicatrizes e exposição a produtos químicos (MARKOVIC et al., 2007).

3.4 Via de Sinalização das MAPKs no Melanoma

A maioria dos melanomas cutâneos mostram mutações ativadoras em genes constituintes da via de sinalização das Proteínas Quinase Ativadas por Mitógeno (MAPKs), como os proto-oncogenes NRAS ou BRAF, componentes da sinalização RAS-RAF-MEK-ERK, representadas na Figura 1 (BROEKAERT et al., 2010). A via das MAPKs em condições fisiológica conecta sinais extracelulares, tais como Fatores de Crescimento e Hormônios, ao núcleo, o que leva à expressão de genes que são relacionados à proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (RAMAN et al., 2007). Quando um ligante se liga ao seu Receptor de Tirosina Quinase (RTK) na membrana plasmática, como por exemplo, o receptor Proteína Tirosina Quinase (KIT), estimula a atividade de RAS. Uma grande efetor de RAS é a família RAF, um grupo de Quinases Serina/ Treonina, que compreende ARAF, BRAF e CRAF (MARAIS et al., 1997).

As proteínas RAF sinalizam, através da fosforilação, a ativação de uma Quinase *downstream*, Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno (MEK), que posteriormente fosforila e ativa a Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK), o qual ativa genes de proliferação celular, por exemplo (MANDALÀ; VOIT, 2013). A complexidade desta via é aumentada pela complexidade dos seus componentes a exemplo destes das famílias já caracterizados como RAS (HRAS, NRAS e KRAS), RAF (ARAF, BRAF e CRAF), MEK (MEK1 e MEK2) e ERK (ERK1 e ERK2), as quais exercem funções não redundantes (MANDALÀ; VOIT, 2013).

A ativação da sinalização MAPK por mutações oncogênicas foi encontrada em até 90% dos casos de melanoma (DAVIES et al., 2002). Portanto, terapias que visam bloquear especificamente os componentes da via MAPK são estratégias de tratamento essenciais para antagonizar essas vias de transdução de sinal patogênicas em melanoma (DHOMEN; MARAIS, 2009).

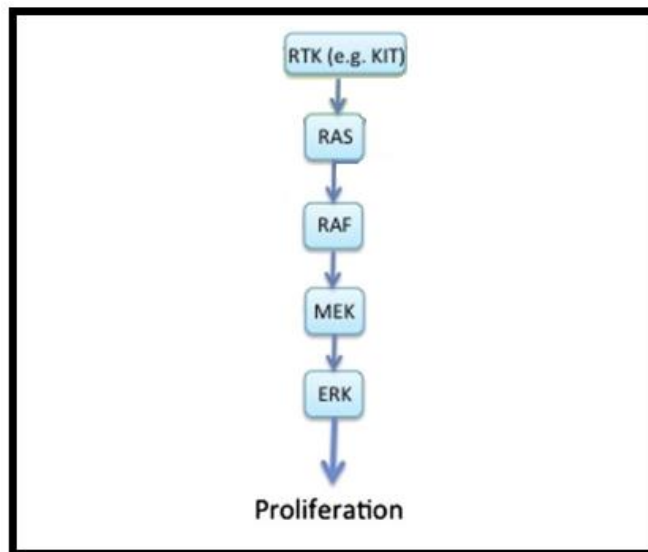


Figura 1 - Cascata de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK.

Fonte: Adaptado de BIS; TSAO, 2013.

3.5 Principais Etiologias

Durante a última década, houve muito progresso na compreensão das alterações genéticas subjacentes ao melanoma. Vias de sinalização críticas, como as das MAPKs, Proteína Quinase Ativada por Mitógeno, e Fosfatidil-inositol 3 quinase, PI3K, são frequentemente mutados no melanoma e foram cuidadosamente dissecados como potenciais vias de terapias futuras (BIS; TSAO, 2013).

3.5.1 Mutações em CDKN2A

O gene que codificada para o Inibidor 2A de Quinase Dependente de Ciclina, CDKN2A, é o primeiro *locus* identificado como fator de risco para o melanoma familiar. Localizado no cromossomo 9p21, o CDKN2A codifica para duas proteínas supressoras de tumor diferentes, a p16^{INK4A} e a p14^{ARF}, ambas envolvidas na regulação do ciclo celular. A p16^{INK4} normalmente inibe a Ciclina Dependente da Quinase 4 (CDK4) e Ciclina Dependente da Quinase 6 (CDK6), impedindo assim a

fosforilação da proteína do Retinoblastoma (pRb) (SNOO; HAYWARD, 2005). A p16 quando mantido no estado não fosforilado permanece ligada a fatores transcricionais como o E2F, o que leva a parada do ciclo celular (FREEDBERG et al., 2008).

A p14^{ARF}, no entanto, bloqueia a degradação de p53 pela HDM2 (Minuto Duplo Humano 2), homóloga da MDM2 em camundongos (Minuto Duplo Murino 2), aumentando a apoptose (SNOO, DE; HAYWARD, 2005). A HDM2 é uma proteína ubiquitina-ligase que suprime a atividade de transcrição do supressor de tumor p53 e promove a sua degradação (PATEL; PLAYER, 2008). A p53 promove a ativação da p21, a qual se liga e inativa complexos de Ciclina-CDK, responsáveis pela transcrição de genes específicos que induzem as células a passarem pelo ponto de checagem G1/S do ciclo celular (CANCER; ATLAS, 2008).

Portanto, alterações genéticas e epigenéticas nas proteínas p16 e p14 que levam ao funcionamento anormal pela perda de função parental (FREEDBERG et al., 2008), induzem o crescimento celular descontrolado. A perda de função da p16 levaria a hiperfosforilação da pRB, a qual induziria uma proliferação descontrolado do ciclo celular, enquanto o não funcionamento da p14 promoveria uma desregulação dos pontos de checagem orientados pela p53 interferindo no controle do ciclo celular (BIS; TSAO, 2013).

Além de mutações germinativas em CDKN2A, mutações autossômicas dominantes oncogênicas no exon 2 de CDK4, foram identificados em menor número em pacientes com melanoma (SNOO; HAYWARD, 2005). As mutações germinativas em CDKN2A foram observadas em cerca de 20 a 57% de famílias com pelo menos três casos de melanoma (BERWICK et al., 2006),

3.5.2 Mutações em NRAS

Proteínas RAS regulatórias, incluindo o Oncogene Viral RAS Homólogo de Neuroblastoma (NRAS), são ativadas através da ligação de GTP (Guanosina Trifosfato) ou mutações na proteína que causam sua ativação constitutiva (BIS; TSAO, 2013). As proteínas RAS são ativadas pelo acoplamento dos ligantes aos

Receptores de Tirosina Quinase, estimulando uma complexa atividade de transcrição nuclear, mediada por rotas metabólicas como as das MAPKs e PI3K, levando a progressão do ciclo celular, diferenciação celular e sobrevivência celular (POSCH; ORTIZ-URDA, 2013). O tipo selvagem de NRAS alterna entre a forma inativa (ligada ao GDP – Guanosina Difosfato) e a forma ativa (ligada ao GTP), enquanto as formas mutantes previnem a hidrólise do GTP, mantendo a proteína permanentemente na sua forma ativa (ligada ao GTP) o que resulta em uma estimulação constante das vias jusantes (POSCH; ORTIZ-URDA, 2013).

Mutações em NRAS foram identificadas em 18 % de tumores de melanoma cutâneo e em 81% de *nevus* melanocítico congênito verdadeiro (LEE et al., 2011). Em melanomas cutâneos, as mutações ativadoras mais comuns em NRAS localizam-se no códon 61: o Q61R (CAA / CGA) e Q61K (CAA / AAA), alterações que conduzem a substituições de glutamina por arginina ou lisina, respectivamente (LEE et al., 2011).

3.5.3 Mutações em BRAF

BRAF é um membro da família de RAF Quinases indutoras de crescimento e de transdução de sinal. A proteína BRAF, uma proteína Serina/Treonina Quinase, tem um papel na regulação da via de sinalização das MAPKs/ERKs, sofrendo regulação de NRAS e promovendo a divisão celular, diferenciação e secreção (SLIPICEVIC; HERLYN, 2012).

Mutações em BRAF ocorrem em cerca de 50% dos melanomas cutâneos e são frequentemente associados com exposição não crônica ao sol. Essa taxa de mutação pode variar entre 25-80% em *nevus*, melanomas primários ou metastáticos e linhagens celulares. Diferenças no relato das mutações em BRAF podem refletir variações nas proporções e nos subtipos histológicos e a inclusão de amostras de melanoma em estágios mais ou menos avançados (THOMAS, 2006). Mais de 30 mutantes de BRAF foram identificadas em tumores, com aproximadamente 90% com mutação localizada no segmento codificador para o sítio de ativação da

proteína no éxon 15, sendo as mutações mais frequentes V600E (troca de valina para ácido glutâmico) e menos frequentes V600K (troca de valina para lisina), e os outros 10% em uma estrutura de Laço P codificado no éxon 11, também responsável por um segmento de ativação de BRAF, caracterizando uma atividade de Quinase elevada representada na Figura 2 (WAN et al., 2004).

A importância do BRAF na biologia dos melanócitos, através do Hormônio Estimulante de α -melanocortina (α -MSH) que inicia proliferação pela ativação de BRAF na cascata de sinalização da ERK Quinase, tem sido citada como uma possível razão para a elevada frequência mutacional de BRAF em melanomas (GARNETT; MARAIS, 2004).

Além das funções mais conhecidas de BRAF V600E como ativador de MEK / ERK, diversas outras atividades têm sido relacionadas a sua atividade oncogênica como: evasão de senescência e apoptose, potencial replicativo sem pontos de checagem, angiogênese (através da ativação HIF-1 α e VEGF dependente de MEK), a invasão de tecidos e metástases (através de regulação positiva de várias proteínas envolvidas na migração, sinalização de integrinas, contratibilidade celular), bem como a evasão da resposta imune (MAURER et al., 2011). Essas características conferem ao melanoma portador de BRAF V600E um comportamento agressivo, justificando seu mau pronóstico e alto índice de mortalidade (MANDALÀ; VOIT, 2013).

A alta incidência de mutações em BRAF e o fenótipo agressivo de melanomas portando mutações nessa proteína resultaram no desenvolvimento de drogas que visam inibir sua atividade oncogênica, além disso, inibidores de BRAF V600E/K aumentam a imunogenicidade do tumor, permitindo tratamentos combinados com imunoterapias (KUDCHADKAR et al., 2013), fomentando ainda mais investimentos nessa diretriz.

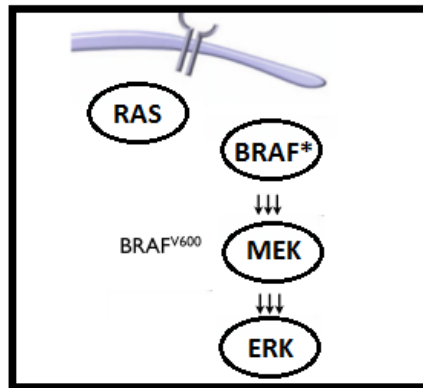


Figura 2 – Cascata de sinalização RAF-MEK-ERK constantemente ativada por BRAF mutado.

Fonte: Adaptado de SULLIVAN; FLAHERTY, 2013.

3.6 Inibidores de BRAF mutado

3.6.1 Sorafenibe

Sorafenibe foi o primeiro inibidor da RAF estudado em pacientes com melanoma (HAUSCHILD et al., 2009).. Inicialmente, este fármaco foi desenvolvido como um inibidor CRAF, entretanto mais tarde foi comprovado que sua inibição se estendia a múltiplos alvos como BRAF, CRAF, Receptor do Fator de Crescimento Derivado da Plaqueta (PDGFR), Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGFR), p38 e C-KIT (Receptor Tironisa Quinase Tipo III) (EISEN et al., 2006). Infelizmente, apesar de ter sido avaliado em numerosos testes clínicos de fase I, II e III como agente único ou em combinação com quimioterapia, a utilidade clínica do Sorafenibe foi desapontante, pois em um estudo com 37 pacientes, apenas 1 apresentou resposta pelo Critério de Avaliação de Tumor Sólido (RECIST). Esse estudo foi seguido por vários testes de Sorafenibe em combinação com agentes citotóxicos, entretanto a eficiência foi muito abaixo do esperado, o que incentivou o desenvolvimento de novos inibidores de BRAF (HAUSCHILD et al., 2009).

3.6.2 Vemurafenibe

Vemurafenibe (PLX4032, RG7204, comercializado como Zelboraf®) é um inibidor oralmente disponível com seletividade 30 vezes maior por BRAF V600E comparado ao BRAF selvagem (JOSEPH et al., 2010).

Vemurafenibe foi o primeiro inibidor de BRAF a completar testes clínicos de fase I, demonstrando benefício clínico significativo (FLAHERTY et al., 2010). Neste estudo, os autores demonstraram que os níveis tumorais de ERK fosforilada (pERK), Ciclina D1 e Ki-67 foram significativamente reduzidos a partir do dia 15 de tratamento em comparação com os níveis no pré-tratamento (MANDALÀ; VOIT, 2013).

No estudo de fase I/II de ensaios clínicos, aproximadamente 80% dos pacientes com estágio IV de melanoma BRAF V600E tratadas com a dose de 960mg duas vezes por dia mostraram benefício com o tratamento com Vemurafenibe. Estas respostas foram associadas com a inibição intratumoral de pERK, relatando um sobrevida média de 13,8 meses (SMALLEY et al., 2012).

Diante dos resultados promissores o Vemurafenibe foi aprovado para o tratamento de melanoma metastático portador de mutação BRAF V600E em agosto de 2011 nos Estados Unidos e em fevereiro de 2012 na União Europeia e no Brasil (BOLLAG et al., 2012).

Apesar do grande sucesso inicial e altas taxas de eficiência que resultaram no aumento da sobrevida dos pacientes com melanoma metastático, relatos posteriores de aquisição de resistência ao tratamento após 7 meses do início do mesmo foram observados (APLIN et al., 2011).

3.6.3 Dabrafenibe

Dabrafenibe (GSK2118436, comercializado como Tafinlar) é um potente inibidor de BRAF mutado por competição por ATP, apresentando seletividade 100

vezes maior por BRAF mutante do que BRAF selvagem em linhagens celulares (MENZIES et al., 2012), o qual foi aprovado para comercialização nos Estados Unidos em Maio de 2013. Em um dos testes clínicos de fase I/ II onde 35 pacientes com BRAF V600E/K foram tratados com duas altas doses (15 pacientes: 150mg duas vezes por dia e 20 pacientes: 200mg duas vezes ao dia) 77% pacientes com mutações V600E tiveram respostas objetivas. O estudo não revelou a resposta específica sobre os pacientes com BRAF V600K. Outro resultado importante foi que 7 dos 10 pacientes com metástase cerebral apresentaram uma redução da metástase, onde 3 deles obtiveram redução completa. Dabrafenibe foi o primeiro inibidor de BRAF com atividade intracranial comprovada (FALCHOOK et al., 2012).

Apesar de o Dabrafenibe apresentar resultados, quanto a eficiência, semelhantes ao Vemurafenibe, o perfil de toxicidade do Dabrafenib parece ser bastante diferente. Dabrafenibe tem menores incidências de Pirexia (estado febril), Fotosensibilidade, Artralgia (dor nas articulações) e Fadiga (MANDALÀ; VOIT, 2013).

Embora os resultados com Dabrafenibe sejam bastante promissores, inevitavelmente muitos dos pacientes deixam de responder ao tratamento após alguns meses do início do mesmo, tornando necessário criar métodos de detecção precoce da resistência adquirida aos inibidores de BRAF (GREGER et al., 2012).

3.7 Mecanismos de Resistência aos inibidores de BRAF

O mais importante limitante na administração de inibidores de BRAF como agentes únicos de tratamento é o tempo de efeito antitumoral relativamente curto. Em ensaios clínicos, a maioria dos pacientes progrediu (reincidiu o crescimento tumoral) após 6-7 meses de tratamento e apenas uma minoria dos pacientes ainda está em terapia após dois anos. Esse subgrupo de pacientes com maior tempo de resposta teve, geralmente, a doença detectada ainda em estágios iniciais. Pelo contrário, quando o melanoma é detectado em estágios mais avançados, portanto com maior carga da doença e mais sintomático, prediz uma menor probabilidade de

regressão tumoral e uma menor duração da resposta antitumoral. Dessa maneira, compreender os mecanismos de resistência pode fornecer pistas tanto para o desenvolvimento de novos medicamentos e para a identificação de novos biomarcadores, quanto para prever e diagnosticar a sensibilidade e a resistência ao tratamento (MANDALÀ; VOIT, 2013).

Infelizmente, alguns tumores de melanoma BRAF mutante não regredem nem mesmo no início do tratamento, caracterizando uma resistência intrínseca e, em outros casos como já mencionado, apesar da impressionante redução inicial do tumor, surge a resistência adquirida que ocorre na grande maioria dos casos (CHAPMAN et al., 2011; GREGER et al., 2012).

Embora as razões porque essa resistência ocorre não são completamente compreendidas, o fenômeno não é totalmente surpreendente: os melanomas são conhecidas por terem padrões múltiplos e complexos de mutações e ampliações genômicas. Como essas múltiplas alterações genéticas interagem para levar à resistência aos inibidores de BRAF é atualmente o foco de intensa investigação (KUDCHADKAR et al., 2013).

A resistência intrínseca, ou seja, aquela que faz com que o paciente não responda ao tratamento em nenhum momento, tem 3 mecanismos principais já indentificados. Por exemplo, uma análise recente de pacientes que receberam Dabrafenibe mostrou que pacientes com melanoma BRAF mutante que apresentaram disfunção em PTEN (Proteína Homóloga de Fosfatase e Tensina) exibiram taxas de resposta mais baixas do que aqueles pacientes cujos tumores possuíam PTEN em funcionamento normal, pois a perda de função de PTEN suprime a apoptose mediada por BIM (proteína da família da BCL-2) (PARAISO et al., 2011; NATHANSON et al., 2013).

A amplificação de Ciclina D1 representa outro mecanismo de resistência intrínseca e quando na presença de outra mutação no gene CDK4, pode conferir resistência ao tratamento. Isso pode ser explicado, pois o bloqueio da via das MAPK leva à diminuição da expressão de Ciclina D1 e uma superexpressão da p27KIP1, inibidor de CDK. Como é necessária a cooperação de Ciclina D1 e CDK4 para a

progressão através do ciclo celular, a hipótese de que a ativação de mutações em CDK4 pode aumentar a resistência a inibidores de BRAF (SMALLEY et al., 2008).

Outros estudos identificaram a proteína Quinase D3 (PRKD3) como um mediador potencial da resistência intrínseca por meio da reativação da sinalização pela via metabólica das PI3K/AKT, via de sobrevivência celular (CHEN et al., 2011).

Diferentemente da resistência intrínseca que pode ser detectada antes do início do tratamento, a resistência adquirida constitui o atual desafio tanto na identificação de novos mecanismos quanto no processo de reversão dos mesmos. Na maioria dos casos, a resistência adquirida aos inibidores de BRAF ocorre devido à heterogeneidade do tumor. Esse fato pode ser explicado devido à existência de pequenas populações de células de melanoma capazes de sobreviver ao tratamento inicial, adquirindo resistência plena tipicamente após 3 a 6 meses após o início do tratamento (PARAISO et al., 2010). Embora não tenha sido relatada aquisição de mutações secundárias no sítio de ligação dos inibidores de BRAF à proteína mutante que poderia impedir a ligação do fármaco, diversos outros mecanismos já foram descobertos (YAUCH et al., 2009).

A partir dos primeiros estudos pré-clínicos a supreexpressão dos Receptores de Tirosina Quinase (RTK) tem demonstrado desempenhar um papel crucial na superação da toxicidade do inibidor de BRAF (NAZARIAN et al., 2010) (Figura 3A). Em particular, o Receptor de Crescimento Derivado de Plaquetas Beta (PDGFRB) e Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1R) estão implicados na ativação das vias PI3K/AKT por estimulação de mTOR (Alvo da Rapamicina em Mamíferos), promovendo a progressão tumoral (ATEFI et al., 2011).

A expressão de isoformas de *splicing* de BRAF também constitui uma forma de resistência. Um estudo conduzido com diversas linhagens celulares resistentes ao Vemurafenibe indentificou formas alternativas de BRAF como 61-KDa BRAF que não possui os éxons 4 a 8, os quais codificam o domínio de ligação das proteínas RAS (Figura 3C). Posteriormente foi comprovado que a expressão de isoformas de BRAF que não possuem o domínio RAS, provoca a dimerização de BRAF (ativação) de uma maneira independente de RAS (POULIKAKOS et al., 2011).

Um segundo mecanismo de resistência diretamente dependente de BRAF foi identificado em um estudo conduzido com 20 pacientes que progrediram com a administração de fármacos contra BRAF mutado. Foi descoberto que 20% dos pacientes apresentavam amplificações gênicas de BRAF através de ganho do número de cópias do gene (Figura 3D). Como o número de BRAF ativo estava aumentado, as doses do fármaco que estavam sendo administradas passavam a ser insuficientes, permitindo a reincidência de crescimento do tumor (SHI et al., 2012). Em testes em modelos pré-clínicos, esse tipo de resistência pode ser revertida com o aumento da dose do inibidor de BRAF (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013).

Mutações secundárias em outras proteínas da via das MAPKs representam mecanismos para burlar o efeito de inibidores de BRAF. Algumas mutações na proteína NRAS, por exemplo, fazem com que ela passe a ativar proteínas alternativas à BRAF (Figura 3B), como o CRAF, permitindo a continuação da cascata de sinalização (NAZARIAN et al., 2010; ATEFI et al., 2011). Mutações ativadoras constitutivas em MEK também já foram descritas por conferir resistência aos inibidores de BRAF (Figura 3E), através da constante estimulação da via das MAPKs, independentemente da ativação prévia por BRAF. Nesse contexto, a resistência pode ser revertida através da aplicação tripla de Inibidores de BRAF, MEK e PI3K/mTOR (VILLANUEVA et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência se dá através da superexpressão de outras MAPKs como COT. Foi demonstrado que a proteína COT (Oncogene de Câncer de Tireóide) também conhecido como MAP3K8, é um agonista da via das MAPKs que é capaz de ativar ERK por mecanismos ligados a MEK que não dependem da ativação prévia por BRAF (Figura 3F). Esse mecanismo de resistência é passível de reversão através da administração conjunta de inibidores de COT e BRAF ou inibidores de BRAF e MEK (JOHANNESSEN et al., 2010).

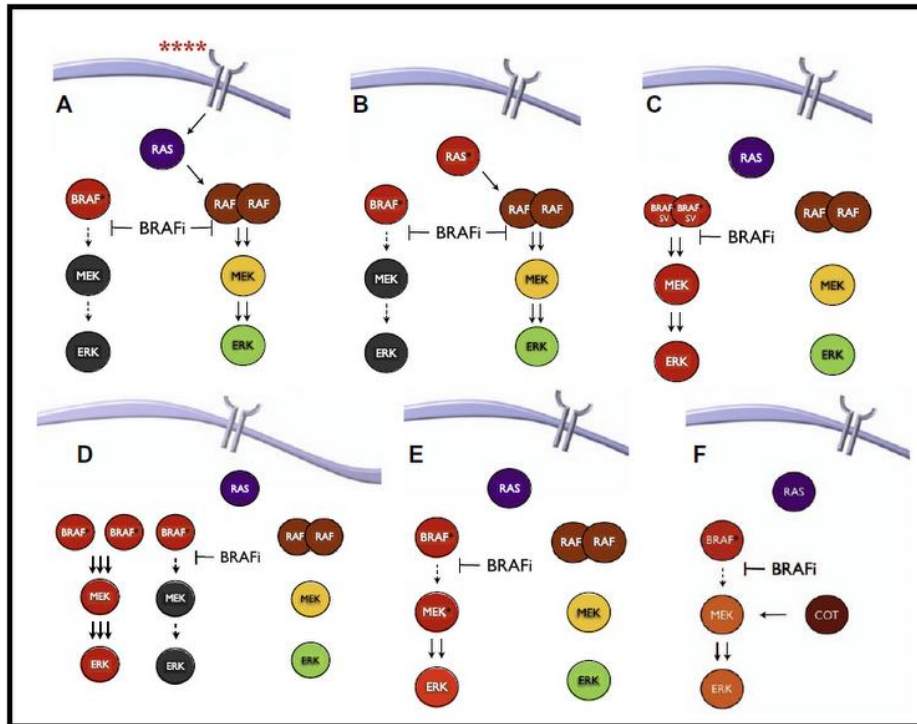


Figura 3 – Mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF.

Fonte: Adaptado de SULLIVAN; FLAHERTY, 2013.

A descoberta de novos mecanismos de resistência adquirida impulsionou um numeroso esforço para identificar métodos de reversão dos mesmos (ATEFI et al., 2011; GREGER et al., 2012; HATZIVASSILIOU et al., 2012; THAKUR, DAS et al., 2013; TENTORI et al., 2013), entretanto faz-se necessário a detecção precoce dos mecanismos de resistência presentes no paciente. Pacientes com melanoma metastático apresentam diversos tumores secundários, os quais podem apresentar diferentes mecanismos de resistência e, por muitas vezes, não são biopsáveis. A possibilidade de se obter um parecer global do metabolismo dos tumores secundários é imensamente apreciável e necessário.

3.8 Exossomos

A maioria das células é conhecida por liberar continuamente fatores solúveis e por esfoliar vesículas derivadas de membrana para o espaço extracelular (THÉRY et

al., 2002). Essas vesículas derivadas de membrana são geralmente discriminadas por tamanho, com duas classes principais, a classe maior é chamada microvesículas (200-1000 nm) e a classe menor, de tamanho nanométrico, é chamada de exossomos (30-200 nm).

Em 1983, essas nanovesículas foram descritas pela primeira vez na externalização do Receptor de Transferrina durante a maturação dos reticulócitos em ovelhas que foram mais tarde denominados exossomos (PAN; JOHNSTONE, 1983). Durante muitos anos, os exossomos foram considerados organelas para remoção de detritos celulares ou proteínas de superfície obsoletas. No entanto, em 1996, os exossomos foram demonstrados estarem envolvidos na apresentação de antígenos, identificando, assim, um papel fundamental em processos imunológicos (RAPOSO et al., 1996).

Além disso, nos últimos anos, os exossomos surgiram como mediadores importantes da comunicação celular e estão envolvidos em ambos processos fisiológicos normais, tais como participação do desenvolvimento das glândulas mamárias (HENDRIX; HUME, 2011), neuroproteção (KALANI et al., 2013), e também no desenvolvimento e progressão de doenças, tais como processo de metástase do melanoma (HOOD et al., 2011), processos infecciosos como os realizados pelo vírus HIV (NARAYANAN et al., 2013), entre outros. A presença dos exossomos foi identificada na maioria dos fluidos corporais, incluindo urina, líquido amniótico, soro, saliva, leite materno, líquido cefalorraquidiano e secreções nasais (HANNAFON; DING, 2013). A complexidade dos mecanismos de atuação do exossomos pode ser presumida pela sua presença em todos os fluidos corporais, além de carregar diversas moléculas biológicas ativas como microRNAs (KHARAZIHA et al., 2012), proteínas (LOGOZZI et al., 2009), mRNA, DNA genômico, DNA mitocondrial e retrotransposons (BARTENEVA et al., 2013). No contexto do câncer, estudos demonstraram que células cancerosas secretam níveis de exossomos em maiores quantidades do que células normais (HENDERSON; AZORSA, 2012), indicando sua potencial utilização como biomarcadores para o diagnóstico da doença (HANNAFON; DING, 2013).

3.8.1 Biogênese Exossomal

Embora o mecanismo detalhado da biogênese dos exossomos permaneça incompletamente definido, os modelos atuais dividem-o em 4 etapas: iniciação, endocitose, formação dos corpos multivesiculares (MVBs) e secreção dos exossomos.

Receptores na membrana plasmática das células podem ser destinados à reciclagem (por exemplo, Receptor de Transferrina, Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade) ou à degradação (por exemplo, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico – EGFR) e esse direcionamento é mediado pela formação de MVBs (KHARAZIHA et al., 2012). Proteínas mono-ubiquitinadas são internalizadas nos endossomos precoces, os quais sofrem invaginação vesicular, formando as Vesículas Intraluminais (ILVs), fazendo que os endossomos passem a se chamar Corpos Multivesiculares (MVBs).

Após a acumulação das vesículas contendo as mais diversas moléculas biológicas, os MVBs são direcionados para a degradação no lisossomo (por exemplo, por ativação de EGF) ou para reciclagem pela rede Trans-Golgi (TGN) ou para a fusão com a membrana plasmática que resulta na liberação das vesículas intraluminais, passando a ser chamadas de exossomos, aptos a desempenhar sistemas complexos de comunicação intercelular (SIMONS; RAPOSO, 2009; LUDWIG; GIEBEL, 2012; KHARAZIHA et al., 2012; BANG; THUM, 2012).

3.8.2 Aplicações Biotecnológicas dos Exossomos

A partir do grande interesse sobre os exossomos na última década e aliado ao seu complexo papel na comunicação celular, surgiram diversas aplicações utilizando os exossomos em diferentes contextos.

Vários estudos de Fase I com exossomos foram concluídos recentemente (VLASSOV et al., 2012). O primeiro usou Exossomos Derivados de Células

Dendríticas Autólogas (DEX). Os DEX foram gerados contendo complexos de MHC/complexos peptídicos funcionais capazes de promover respostas imunes de células T. Para tal finalidade os pesquisadores anexaram peptídeos antigênicos MAGE 3 diretamente nos exossomos purificados dos pacientes. Após a injeção de DEX nos pacientes, foi observado um aumento do número de células *Natural Killers* e foi observado que expressão NKG2D foi restabelecida em células NK e células T CD8. Não houve toxicidade severa e nenhum nível de dose máxima foi alcançado, indicando a segurança da administração dos exossomos como vacina terapêutica (ESCUDIER et al., 2005).

Os exossomos constituem também um mecanismo valioso para diagnóstico patológico através, por exemplo, de proteínas tumorais, assim como, mRNA e microRNA. Com esse intuito, um estudo piloto conduzido para validar o exossomos presentes na urina como portadores de informações genéticas e, conseqüentemente, potencial biomarcadores de câncer de próstata. Nesse estudo foram amplificados dois biomarcadores de mRNA prognósticos, sendo um deles o PCA-3 (Antígeno 3 de Câncer de Próstata) e o outro é um produto de um rearranjo cromossômico, o que cria um transcrito comum em câncer de próstata, o TMPRSS2:ERG. Através do acompanhamento desses dois produtos através dos exossomos, foi possível acompanhar a evolução do *status* da doença, permitindo prever o genótipo/fenótipo tumoral e o potencial metastático (NILSSON et al., 2009).

Além das aplicações citadas, os exossomos constituem potenciais ferramentas em diversos outros contextos como *Drug Delivery* (SHTAM et al., 2013), transfeção gênica (KOGURE et al., 2013), reprogramação celular (QUESENBERRY; ALIOTTA, 2010), entre outras.

4. Metodologia

4.1 Cultivo de Células

Linhagens de melanoma sensíveis/parentais (M229, M238 e M249) e resistentes (M229AR9, M238AR2 e M249AR4) ao fármaco PLX4032, homozigotas para mutação BRAF V600E e obtidas, previamente, pelo laboratório a partir de cultivo primário de células de pacientes com melanoma metastático, foram cultivadas em RPMI (Corning Cellgro), 10% FBS (Soro Fetal Bovino - Omega Scientific) e 1% de PSF (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B - Omega Scientific).

O FBS utilizado foi submetido a uma ultracentrifugação de 100000xg por 70 minutos para retirar os exossomos bovinos presentes no mesmo e o sobrenadante coletado foi posteriormente filtrado a vácuo usando membrana de 0.22 μ m (*Sterile 50ml Disposable Vacuum Filtration System* – Millipore) para promover sua esterilidade. As linhagens resistentes foram cultivadas em 1 μ M de Vemurafenibe (PLX4032) que foi obtido por MTA (Acordo de Transferência de Material) com a Plexikon (Berkeley, CA) e Roche (Nutley, NJ). O PLX4032 foi dissolvido em DMSO (Sulfóxido de Dimetilo – Fisher Scientific).

As células foram incubadas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ até atingirem um estágio de subconfluência de aproximadamente 80%, onde as células foram destinadas para as análises proteicas e o sobrenadante para o isolamento dos exossomos.

4.2 Isolamento dos Exossomos

O método de isolamento padrão dos exossomos é extramente laborioso e é feito por Centrifugação Diferencial (300xg por 10 min, 2000xg por 10 min, 10000xg por 30 min, 100000xg por 70 min, 100000xg por 70 min) (THÉRY et al., 2006), não permitindo análises em alta escala. Com o intuito de criar um método de detecção de resistência adquirida ao tratamento de melanoma que facilite sua execução,

testamos dois métodos alternativos ao isolamento padrão de exossomos, o Kit comercialmente disponível Exoquick® (System Biosciences) e um protocolo otimizado de isolamento de exossomos de biofluidos (GALLO et al., 2012).

O método de Exoquick® consiste no isolamento exossomal por precipitação dos exossomos conjugados com um polímero presente nesse kit. O protocolo de isolamento inicia com a centrifugação do sobrenadante do cultivo celular a 3000xg por 15 minutos para retirar células mortas. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um tubo estéril e adicionou-se o Exoquick® em uma proporção de 5 partes de sobrenadante para 1 parte de Exoquick®. Manteve-se o tubo em refrigeração a 4°C por 12 horas e posteriormente foi realizada uma centrifugação de 1500xg por 30 minutos para formar o *pellet* de exossomos/polímero. Retirou-se o sobrenadante, descartando-o e o tubo foi submetido a uma nova centrifugação de 1500xg por 5 minutos para retirar todos os traços de sobrenadante remanescentes.

O protocolo otimizado para biofluidos (GALLO et al., 2012) foi testado para verificar sua eficiência no isolamento de exossomos de cultivo celular e constitui 3 centrifugações: 1500xg por 15 minutos para retirar células mortas, o sobrenadante coletado é centrifugado a 17000xg por 15 minutos para retirar restos celulares e agregados proteicos e, novamente, o sobrenadante é centrifugado a 160000xg por 70 minutos para isolar os exossomos na forma de *pellet*. Essa última ultracentrifugação foi realizada a 4°C utilizando tubos de Polialomero (Beckman Coulter), o rotor SW 32 Ti (Beckman Coulter) e a ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter).

4.3 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica foi realizada para confirmar os protocolos de isolamento de exossomos. Esse experimento foi realizado como um serviço contratado e foi conduzido no Instituto de Patologia da UCLA. Basicamente o *pellet* da centrifugação final dos dois métodos de isolamento foram ressuspensos em cerca de 10µL de água. Em seguida, foram adicionados 50µL de 2%

Paraformaldeído e 5µL dessa mistura foi depositada em Grides de microscopia eletrônica cobertos com Carbono-Formvar e foram deixados para absorção por 20 minutos. Após a secagem os grids foram, sutilmente, lavados com PBS e foi adicionado um volume de 50µL de 2% de Glutaraldeído por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 100µL de água destilada, deixando o gride com essa mistura por 2 minutos antes de invertê-lo para permitir uma sequência de 8 lavagens. Para realizar o contraste, foram adicionados 50µL de Oxalato de Uranilo por 5 minutos, inverteu-se o gride para retirar essa solução e adicionaram-se 50µL Metilcelulose por 10 minutos no gelo. Removeu-se o excesso de solução no gride com um papel filtro e deixou-se o gride secar por 10 minutos. Após esses processamentos o gride foi observado em um microscópio de transmissão eletrônico.

4.4 Citometria de Fluxo

Um segundo método de confirmação de isolamento dos exossomos foi realizado por detecção da proteína CD63, um marcador molecular de exossomos. A citometria de fluxo anti-CD63 não foi utilizada para os exossomos isolados pelo Exoquick® devido à dificuldade de aplicações *downstream* na presença do polímero utilizado para a precipitação dos exossomos por esse kit, o que será discutido nos resultados.

A citometria de fluxo anti-CD63 foi realizada para os exossomos obtidos pelo isolamento otimizado (GALLO et al., 2012) seguindo o protocolo recomendado pela empresa Invitrogen utilizando o *kit Exosome - Human CD63 Isolation/Detection®* (Invitrogen). Após a última centrifugação do protocolo de isolamento de exossomos, o *pellet* foi ressuspendido em 100µL de *Isolation Buffer* e foram adicionados 20µL dos *Beads Magnéticos Dynabeads®* que são conjugados com um anticorpo anti-CD63 presentes no kit da Invitrogen. Essa mistura ficou incubada por 18 horas sob agitação a 4°C e os tubos foram centrifugados por 3 segundos para formar um *pellet* dos exossomos ligados aos *Dynabeads®*, o qual foi lavado 3 vezes com o *Isolation*

Buffer com o auxílio de um ímã e foram ressuspensos em um volume final de 300µL de *Isolation Buffer*.

Em seguida, os exossomos ligados aos *Dynabeads*® estavam prontos para a incubação com os anticorpos desejados. Foram transferidos 100µL dessas amostras para um novo tubo e adicionados 6µL de FITC anti-CD63 (BD Biosciences), seguido de incubação por 45 minutos a temperatura ambiente sob agitação. As amostras foram lavadas com 300µL de *Isolation Buffer* e ressuspensas em 200µL de *Isolation Buffer* para a citometria de fluxo, realizada no Citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD Biosciences).

4.5 Extração e Determinação de Concentração Proteica

As células cultivadas até a subconfluência de aproximadamente 80% tiveram seu sobrenadante coletado para o isolamento dos exossomos e as células foram expostas a Tripsina EDTA (Omega Scientific) por 4 minutos e adicionadas 4mL de meio de cultivo, seguidas de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O *pellet* de células formado foi mantido e as células foram lisadas com 750µL tampão RIPA (radioimunoprecipitação – Thermo Scientific), contendo o Coquetel de Inibição de Protease (Roche) e Inibidores de Fosfatase A/B (Thermo Scientific). Essa solução foi mantida por 10 minutos em gelo e, posteriormente, aliqüotada em tubos com 100µL. A extração de proteínas dos exossomos segue os mesmos padrões da extração em células diferindo somente no volume de tampão de lise, o qual é de 100µL devido à baixa concentração de proteínas exossomais comparadas às células.

A medição da concentração proteica foi realizada com o *BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific) seguindo o protocolo sugerido pela empresa, onde o Reagente A e o Reagente B são misturados em uma proporção de 980µL: 20µL, respectivamente, e adicionou-se 5µL das amostras da extração proteica que posteriormente foram incubadas por 30 minutos a 37°C. As amostras foram analisadas utilizando um espectrofotômetro, fornecendo a concentração de proteínas das amostras.

4.6 SDS –Page, Coomassie Blue e Western Blot

Para a realização do SDS-Page as proteínas foram reduzidas com *4x Laemmli Sample Buffer* e Beta-Mercaptoetanol e incubadas a 95°C por 5 minutos para desnaturação. As amostras foram aplicadas com a mesma concentração de proteínas em gel de sistema PAGE 12% (Mini-PROTEAN TGX - Bio Rad), sob uma voltagem de 150V por 60 minutos, utilizando tampão de 1X Tris-glicina (Bio Rad).

Para verificar se o perfil proteico dos exossomos corresponde ao perfil proteico da célula parental foi realizada uma coloração por Coomassie Blue, onde o corante se liga a todas as proteínas presentes na amostra. Foi utilizado o *kit Colloidal Blue Staining* (Life Technologies) seguindo o protocolo da empresa. Após a corrida do SDS-Page o gel é retirado e submerso em uma mistura contendo 55mL de água deionizada, 20mL de Metanol, 5mL do Corante A e 20mL do Corante B, permanecendo sob agitação por 7 horas. Após a coloração, o gel permaneceu lavando com 200mL de água deionizada por 7 horas e posteriormente foi registrado por *scaneamento* das bandas de proteínas.

O Western Blot foi realizado para observar a expressão de proteínas envolvidas na biologia do melanoma e na aquisição de resistência ao tratamento com inibidores de V600E BRAF. Após o SDS-Page, o gel foi retirado e lavado com PBS, enquanto a membrana de PVDF (Thermo Scientific) foi ativada com Metanol (Sigma Aldrich). Em seguida a transferência das proteínas do gel para a membrana foi executada a uma voltagem de 100V por 60 minutos. A membrana contendo as proteínas foi bloqueada com Albumina (Thermo Scientific) por 60 minutos, além de a mesma ter sido utilizada para diluir os anticorpos primários e secundários. Os anticorpos primários para CD63 (Santa Cruz Biotechnology), PDGFR-B (Cell Signaling), CAV-1 (BD Biosciences), MART-1 (Santa Cruz Biotechnology) e GAPDH (Cell Signaling) sofreram diluições de 1:1000, enquanto os anticorpos secundário anti-camundongo e anti-coelho foram diluídos na proporção de 1:5000.

Os anticorpos primários foram incubados *overnight* 4°C e após a incubação

foram submetidos a 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS e 0.1% de *Tween 20* (Bio Rad). A incubação com os respectivos anticorpos secundários ocorreu por 30 minutos a temperatura ambiente com posterior seção de 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS e 0.1% de *Tween 20* (Bio Rad).

As bandas foram visualizadas através da reação de quimioluminescência conduzida pelo *kit ECL Plus* (Thermo Scientific) seguindo o protocolo sugerido pela empresa e reveladas por Raio -X (Denville).

5. Resultados e Discussão

O cultivo das linhagens celulares de melanoma sensíveis e resistentes ao fármaco PLX4032 possibilitou o isolamento dos exossomos pelos dois métodos testados, por Exoquick® e pelo protocolo otimizado para biofluidos. Entretanto, o isolamento dos exossomos pelo Exoquick® impossibilitou aplicações *downstream* como Western Blot, possivelmente pela presença do polímero para precipitação do exossomos, sendo o mesmo incompatível com os nossos sistemas de análises proteicas (Bio Rad). Dessa maneira, prosseguimos com as análises utilizando os exossomos isolados pelo método de Gallo, 2012, o qual demonstrou ser um método de isolamento eficiente para exossomos de cultivo celular, apesar de ter sido modificado para biofluidos. O mesmo demonstrou ser um método com tempo de procedimento muito menor devido ao número reduzido de etapas de centrifugação, portanto tornando-o um protocolo menos oneroso e apto a ser empregado em análises em alta escala.

A Microscopia Eletrônica confirmou uma população de exossomos com tamanho médio de 80–100 nm de diâmetro (Figura 4), aparentemente íntegros e com conformação vesicular mantida, além da suspensão enriquecida de exossomos obtidas através da última ultracentrifugação de 160000xg fornecer um *pellet* com poucos restos membranosos/celulares.

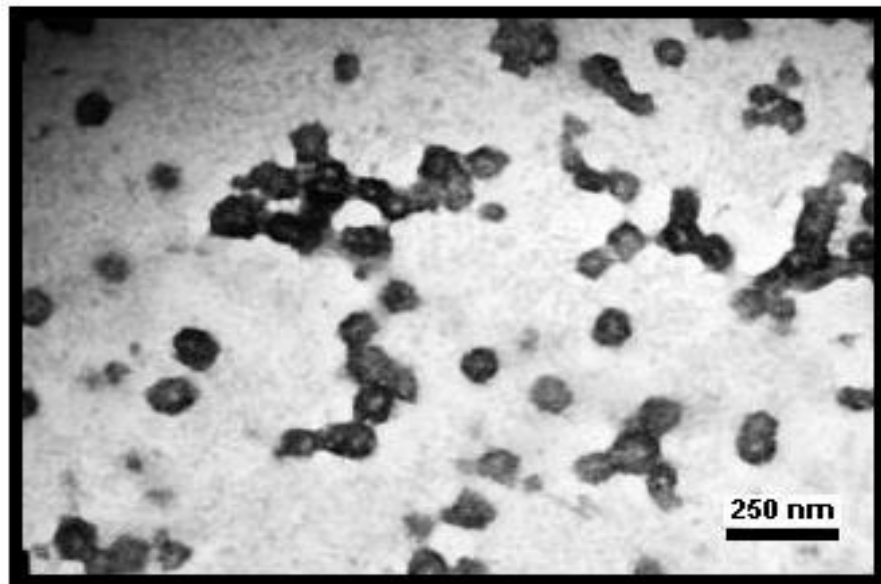


Figura 4 - Imagem da Microscopia Eletrônica confirmando o isolamento dos exossomos utilizando o protocolo otimizado para biofluidos.

A Citometria de Fluxo anti-CD63 forneceu uma segunda confirmação do isolamento dos exossomos que, por ser uma técnica altamente sensível, é recomendável para confirmar a presença de exossomos quando se usa um protocolo novo. Devido ao fato dos exossomos serem muito pequenos, a grande maioria dos Citômetros de Fluxo não consegue detectá-los, exigindo assim, sua conjugação com *Beads*, como os *Dynabeads*®. O *kit* utilizado (*kit Exosome - Human CD63 Isolation/Detection*®) promoveu uma dupla confirmação da positividade para o marcador molecular exossomal CD63. Como os *beads* magnéticos são conjugados com anticorpos anti-CD63 eles selecionam somente as vesículas exossomais e isso, acrescido a incubação com os anticorpos FITC anti-CD63 confirmou que as vesículas isoladas são exossomos (Figura 5).

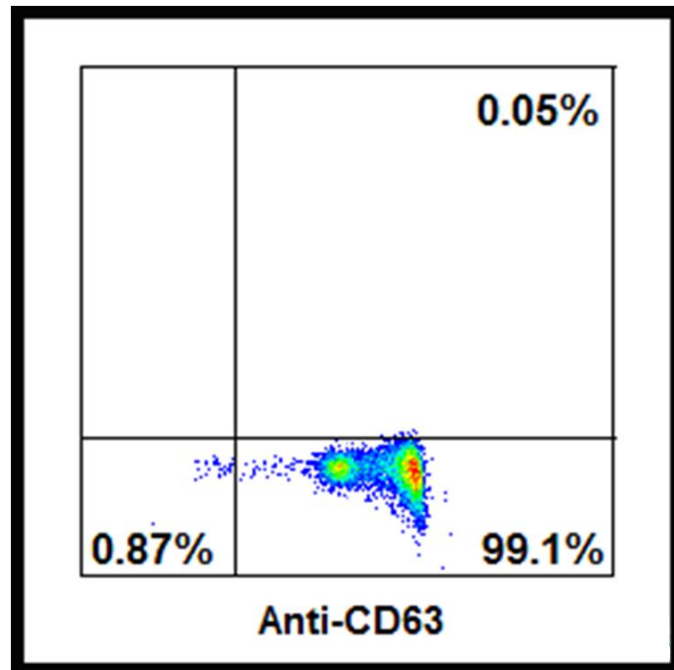


Figura 5 - Citometria de Fluxo confirmando que 99,1% dos exossomos são positivos para CD63. O quadrante inferior direito representa os exossomos positivos para CD63 e os demais quadrantes exossomos negativos para CD63.

O experimento de coloração por Coomassie Blue demonstrou que apesar de muitas bandas proteicas serem compartilhadas entre exossomos e suas células parentais, muitas proteínas diferem entre as mesmas (Figura 6). Isso corrobora com o conhecimento de que as células possivelmente traduzam proteínas para compor especificamente o conteúdo dos exossomos, assim como, outras moléculas biológicas a exemplo dos microRNAs e mRNA (XIAO et al., 2012), para serem endereçadas a outros locais, participando na comunicação celular e imunomodulação. Na Figura 5 também se pode notar que algumas bandas proteicas são características dos exossomos, pois células sensíveis e resistentes as possuem, caracterizando, possivelmente, proteínas da biogênese exossomal.

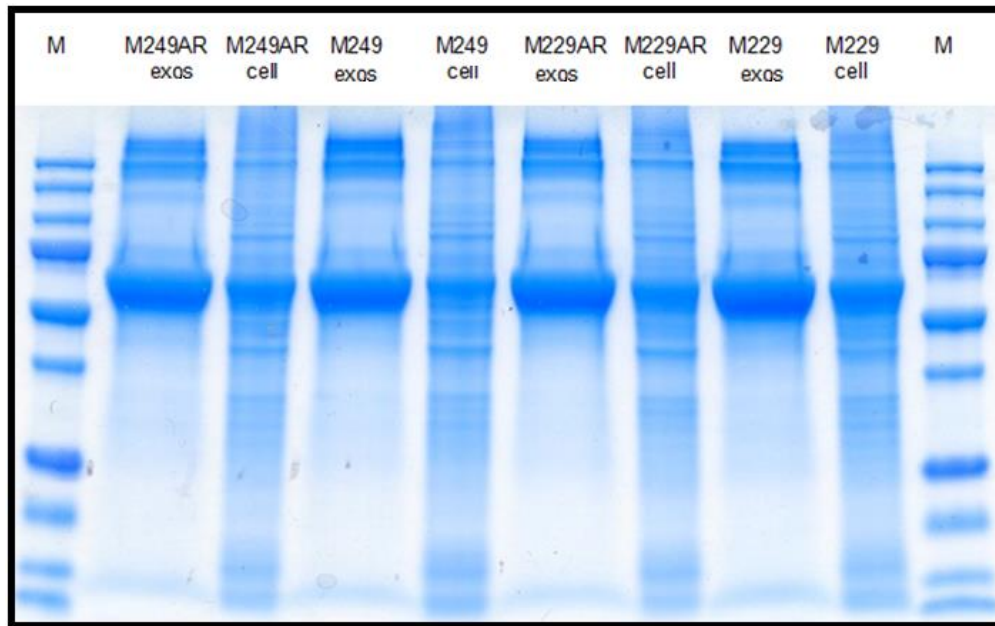


Figura 6 - Coloração por Coomassie Blue. Foram aplicados 15µg de proteínas. M (marcador), Cell (célula) e Exos (exossomos).

Outra observação importante é que mesmo aplicando-se concentrações de proteínas iguais entre células e exossomos, as bandas exossomais são muito mais brandas que as das células, fato que pode ser explicado pela contaminação de BSA (Albumina Sérica Bovina) que representa a maior banda presente nas amostras dos exossomos. Esse evento é caracterizado pela presença de BSA no FBS que constitui o meio de cultivo celular e sua remoção se dá principalmente pela lavagem com PBS antes da extração proteica. Entretanto a lavagem com PBS dos exossomos constitui a ressuspensão do *pellet* da centrifugação final, seguida de uma nova ultracentrifugação de 160000xg. Esse acréscimo de etapa aumenta o tempo do protocolo, além de promover uma perda expressiva no número de exossomos. O uso de uma etapa de lavagem de exossomos é possível durante pesquisas científicas, entretanto pode inviabilizar uma aplicação em alta escala pela perda do número de exossomos além de estender o tempo de execução do protocolo. A presença de BSA, no entanto, não afeta a detecção de outras proteínas, dessa maneira resolvemos não lavar os exossomos com o intuito de criar um método de detecção de proteínas exossomais clinicamente aplicável.

Como observado no Coomassie Blue, a expressão de algumas proteínas

pode divergir entre células e exossomos, exigindo uma detecção cautelosa para proteínas específicas no desenvolvimento do melanoma e na aquisição de resistência ao tratamento com inibidores de BRAF mutado. Dessa maneira, prosseguimos com as análises proteicas por Western Blot, demonstrando que algumas proteínas tem expressão semelhante entre células e exossomos, permitindo inclusive observar alterações de expressão em contextos específicos.

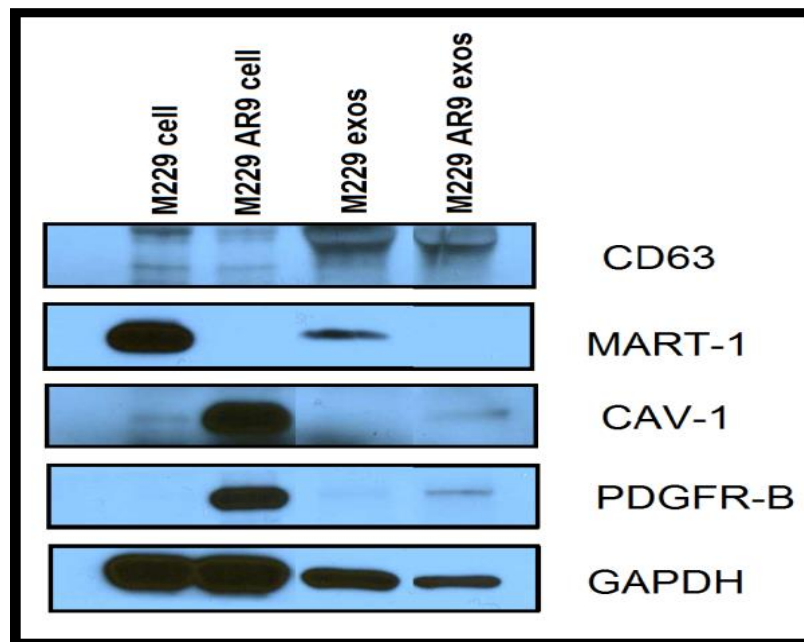


Figura 7 - Western Blot. Foram aplicados 15µg de proteínas para os exossomos e 5µg para as células. Cell (célula) e Exos (exossomo).

As proteínas presentes na Figura 7 apresentam expressão semelhante entre as células e seus exossomos correspondentes, inclusive as diferenças de expressão entre as linhagens sensíveis e resistentes ao fármaco PLX4032. A proteína MART-1, marcador molecular para melanoma, envolvida no processo de maturação do melanosomo (HOASHI et al., 2005), apresenta expressão acentuada na linhagem sensível ao fármaco (M229), enquanto na linhagem resistente (M229AR9) há uma perda de expressão da mesma, fato que pode ser observado nos exossomos. A perda de expressão de MART-1 pode ser consequência do processo de desdiferenciação da célula na aquisição de resistência ao fármaco e já foi relatada

sua expressão heterogênea, especialmente em melanomas em estágio metastático (TAP et al., 1996).

A proteína CAV-1 (Caveolina- 1) já foi demonstrada ser altamente expressa em exossomos secretados por células de melanoma humano, enquanto apresentase quase indetectável em exossomos de pacientes saudáveis, idealizando um potencial marcador molecular para exossomos de melanoma (LOGOZZI et al., 2009). Por esse motivo escolhemos observar sua expressão por Western Blot e, surpreendentemente, foi notado que sua expressão é aumentada nas células resistentes (M229AR9) ao fármaco PLX4032, fato não reportado até o momento. Uma possível explicação dessa observação é que a CAV-1 liga as subunidades de Integrina na Tirosina Quinase FYN, passo inicial da ligação das Integrinas na cascata RAS-ERK, promovendo o progresso do ciclo celular (WARY, 1998) e, no caso de resistência aos inibidores de BRAF, possível reativação da via de sinalização das MAPK.

Já a proteína PDGFR-B está envolvido em um mecanismo já caracterizado de resistência ao tratamento de melanoma por inibidores de BRAF mutado. Sua superexpressão leva a uma reativação da cascata de sinalização das MAPKs, induzindo a proliferação celular. Sua expressão aumentada já foi relatada nas linhagens resistente de melanoma M229AR9 (NAZARIAN et al., 2010), a qual também pode ser observada nos exossomos resistentes de M229AR9 quando comparada a linhagem sensível, M229.

A possibilidade de detectar a expressão diferenciada nos exossomos de proteínas envolvidas na biologia do melanoma e na aquisição de resistência ao tratamento possibilita a utilização dos exossomos como ferramentas para acompanhamento da doença no paciente. Esse método pode ser futuramente aplicado em pacientes através do isolamento de exossomos do plasma por imunocapturação de exossomos positivos para marcadores moleculares de melanoma como MART-1, GP100 e possivelmente CAV-1. Isso garantirá que analisemos exossomos de origem do melanoma, tornando possível a análise do tumor de forma indireta, principalmente em sítios de localização de difícil acesso para biopsias ou cirurgias. Além disso, o acompanhamento do perfil de expressão do

tumor através dos exossomos fornecerá um parecer global dos mecanismos de resistência que possam estar emergindo em diferentes sítios metastáticos, pois devido à independência dos mesmos, pode haver mecanismos de resistência distintos em um mesmo paciente (ROMANO et al., 2013).

O isolamento de exossomos de pacientes poderá ainda ser realizado de forma não invasiva, através do processamento da urina ou saliva, tornando-o um método pacível de aplicação em exames de rotina.

6. Considerações Finais

A oportunidade de realizar o meu Trabalho de Conclusão de Curso na UCLA contribui imensuravelmente para a minha formação acadêmica, amadurecimento pessoal e incentivo profissional. Os resultados obtidos sugerem que os exossomos tem uma potencial aplicação no desenvolvimento de um método de diagnóstico de resistência adquirida ao tratamento de melanoma por inibidores de BRAF mutado. Realizamos o primeiro trabalho que detecta proteínas diferencialmente expressas em linhagens celulares resistentes e sensíveis ao PLX4032.

A expressão aumentada de PDGFR-B pode ser detectada nas linhagens resistentes e, teoricamente, os exossomos podem ser usados para a identificação precoce dos demais mecanismos de resistência como, expressão de diferentes isoformas de BRAF, superexpressão de outros Receptores de Tirosina Quinase, superexpressão de diferentes MAPKs, entre outros.

Apesar da necessidade de confirmação *in vivo*, os dados obtidos, potencialmente, poderão ser aplicados em pacientes que estejam sendo tratados contra o melanoma, possibilitando o acompanhamento da expressão de proteínas relacionadas tanto a resistência quanto ao prognóstico da doença. Esse possível método poderá ser aplicado a pacientes em estágios metastáticos onde a biopsia não é passível de execução, garantindo um acompanhamento mais detalhado da terapia, além de ser um método não invasivo, pois os exossomos poderiam ser coletados através da saliva ou urina.

Referências

- APLIN, A. E.; KAPLAN, F. M.; SHAO, Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 9, p. 1817–20, 2011.
- ATEFI, M.; EUW, E. VON; ATTAR, N.; et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28973, 2011.
- BANDARCHI, B.; JABBARI, C. A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 8, p. 644–8, 2013.
- BANDARCHI, B.; MA, L.; NAVAB, R.; SETH, A.; RASTY, G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology research and practice**, v. 2010, 2010.
- BANG, C.; THUM, T. Exosomes: new players in cell-cell communication. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 11, p. 2060–4, 2012.
- BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBYEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 49, 2013.
- BERWICK, M.; ORLOW, I.; HUMMER, A. J.; et al. The prevalence of CDKN2A germline mutations and relative risk for cutaneous malignant melanoma: an international population-based study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a**

publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 15, n. 8, p. 1520–5, 2006.

BIS, S.; TSAO, H. Melanoma genetics: the other side. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 2, p. 148–55, 2013.

BOLLAG, G.; TSAI, J.; ZHANG, J.; et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 11, p. 873–86, 2012.

BROEKAERT, S. M. C.; ROY, R.; OKAMOTO, I.; et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. **Pigment cell & melanoma research**, v. 23, n. 6, p. 763–70, 2010.

CANCER, T.; ATLAS, G. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061–8, 2008.

CHAPMAN, P. B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–16, 2011.

CHEN, J.; SHEN, Q.; LABOW, M.; GAITHER, L. A. Protein kinase D3 sensitizes RAF inhibitor RAF265 in melanoma cells by preventing reactivation of MAPK signaling. **Cancer research**, v. 71, n. 12, p. 4280–91, 2011.

CORCORAN, C.; RANI, S.; O'BRIEN, K.; et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50999, 2012.

DAVIES, H.; BIGNELL, G. R.; COX, C.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 2002.

DHOMEN, N.; MARAIS, R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 529–45, ix, 2009.

EISEN, T.; AHMAD, T.; FLAHERTY, K. T.; et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. **British journal of cancer**, v. 95, n. 5, p. 581–6, 2006.

ESCUDIER, B.; DORVAL, T.; CHAPUT, N.; et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. **Journal of translational medicine**, v. 3, n. 1, p. 10, 2005.

FALCHOOK, G. S.; LONG, G. V; KURZROCK, R.; et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, v. 379, n. 9829, p. 1893–901, 2012.

FEDORENKO, I. V; PARAISSO, K. H. T.; SMALLEY, K. S. M. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 201–9, 2011..

FLAHERTY, K. T.; PUZANOV, I.; KIM, K. B.; et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 9, p. 809–19, 2010.

FREEDBERG, D. E.; RIGAS, S. H.; RUSSAK, J.; et al. Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 11, p. 784–95, 2008.

GALLO, A.; TANDON, M.; ALEVIZOS, I.; ILLEI, G. G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e30679, 2012.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer cell**, v. 6, n. 4, p. 313–9, 2004.

GRANT-KELS, J. M.; GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 3–9, 2009.

GREGER, J. G.; EASTMAN, S. D.; ZHANG, V.; et al. Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 909–20, 2012.

HANNAFON, B. N.; DING, W.-Q. Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14240–69, 2013.

HATZIVASSILIOU, G.; LIU, B.; O'BRIEN, C.; et al. ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 5, p. 1143–54, 2012.

HAUSCHILD, A.; AGARWALA, S. S.; TREFZER, U.; et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 17, p. 2823–30, 2009.

HENDERSON, M. C.; AZORSA, D. O. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 38, 2012.

HENDRIX, A.; HUME, A. N. Exosome signaling in mammary gland development and cancer. **The International journal of developmental biology**, v. 55, n. 7-9, p. 879–87, 2011.

HOASHI, T.; WATABE, H.; MULLER, J.; et al. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14006–16, 2005.

HOOD, J. L.; SAN, R. S.; WICKLINE, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. **Cancer research**, v. 71, n. 11, p. 3792–801, 2011.

HURST, E. A.; HARBOUR, J. W.; CORNELIUS, L. A. Ocular Melanoma. , v. 139, 2003.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em:
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma.
Acessado em: 21 de dezembro de 2013.

JEMAL, A.; THOMAS, A.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 1, p. 23–47, 2013.

JOHANNESSEN, C. M.; BOEHM, J. S.; KIM, S. Y.; et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 968–72, 2010.

JOSEPH, E. W.; PRATILAS, C. A; POULIKAKOS, P. I.; et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14903–8, 2010.

KALANI, A.; TYAGI, A.; TYAGI, N. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. **Molecular neurobiology**, 2013.

KHARAZIHA, P.; CEDER, S.; LI, Q.; PANARETAKIS, T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1826, n. 1, p. 103–11, 2012.

KOGURE, T.; YAN, I. K.; LIN, W.-L.; PATEL, T. Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. **Genes & cancer**, v. 4, n. 7-8, p. 261–72, 2013.

KUDCHADKAR, R. R.; SMALLEY, K. S. M.; GLASS, L. F.; TRIMBLE, J. S.; SONDAK, V. K. Targeted therapy in melanoma. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 2, p. 200–8, 2013.

LEE, C.; COLLICHIO, F.; OLLILA, D.; MOSCHOS, S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. **Clinics in dermatology**, v. 31, n. 2, p. 141–7, 2013.

LEE, J.-H.; CHOI, J.-W.; KIM, Y.-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **The British journal of dermatology**, v. 164, n. 4, p. 776–84, 2011.

LOGOZZI, M.; MILITO, A. DE; LUGINI, L.; et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5219, 2009.

LUDWIG, A.-K.; GIEBEL, B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 1, p. 11–5, 2012.

MANDALÀ, M.; VOIT, C. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 87, n. 3, p. 239–55, 2013.

MARAIS, R.; LIGHT, Y.; PATERSON, H. F.; MASON, C. S.; MARSHALL, C. J. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4378–83, 1997.

MARKOVIC, S. N.; ERICKSON, L. A.; RAO, R. D.; et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. **Mayo Clinic proceedings**, v. 82, n. 3, p. 364–80, 2007.

MAURER, G.; TARKOWSKI, B.; BACCARINI, M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. **Oncogene**, v. 30, n. 32, p. 3477–88, 2011.

MENZIES, A. M.; LONG, G. V; MURALI, R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. **Drug design, development and therapy**, v. 6, p. 391–405, 2012.

MORENO, M.; SCHMITT, R. L.; LANG, M. G.; GHENO, V. Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. **Journal of skin cancer**, v. 2012, p. 917346, 2012.

NARAYANAN, A.; IORDANSKIY, S.; DAS, R.; et al. Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 27, p. 20014–33, 2013.

NATHANSON, K. L.; MARTIN, A.-M.; WUBBENHORST, B.; et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 17, p. 4868–78, 2013.

NAZARIAN, R.; SHI, H.; WANG, Q.; et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973–7, 2010.

NCA. National Cancer Institute. Disponível em:
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/Patient/page2>.
Acessado em: 21 de dezembro de 2013.

NILSSON, J.; SKOG, J.; NORDSTRAND, A; et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 100, n. 10, p. 1603–7, 2009.

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967–78, 1983.

PARAISO, K. H. T.; FEDORENKO, I. V; CANTINI, L. P.; et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. **British journal of cancer**, v. 102, n. 12, p. 1724–30, 2010.

PARAISO, K. H. T.; XIANG, Y.; REBECCA, V. W.; et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. **Cancer research**, v. 71, n. 7, p. 2750–60, 2011.

PATEL, S.; PLAYER, M. R. Small-molecule inhibitors of the p53-HDM2 interaction for the treatment of cancer. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 12, p. 1865–82, 2008.

POSCH, C.; ORTIZ-URDA, S. NRAS mutant melanoma--undrugable? **Oncotarget**, v. 4, n. 4, p. 494–5, 2013.

POULIKAKOS, P. I.; PERSAUD, Y.; JANAKIRAMAN, M.; et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). **Nature**, v. 480, n. 7377, p. 387–90, 2011.

QUESENBERRY, P. J.; ALIOTTA, J. M. Cellular phenotype switching and microvesicles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 12, p. 1141–8, 2010.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100–12, 2007.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, W.; et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161–72, 1996.

ROMANO, E.; PRADERVAND, S.; PAILLUSSON, A.; et al. Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with BRAFV600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 20, p. 5749–57, 2013.

SCHMERLING, R. A.; LORIA, D.; CINAT, G.; et al. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 30, n. 5, p. 431–8, 2011.

SHENENBERGER, D. W. Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. **American family physician**, v. 85, n. 2, p. 161–8, 2012.

SHI, H.; MORICEAU, G.; KONG, X.; et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. **Nature communications**, v. 3, p. 724, 2012.

SHTAM, T. A.; KOVALEV, R. A.; VARFOLOMEEVA, E. Y.; et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 11, p. 88, 2013.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 4, p. 575–81, 2009.

SLIPICEVIC, A.; HERLYN, M. Narrowing the knowledge gaps for melanoma. **Upsala journal of medical sciences**, v. 117, n. 2, p. 237–43, 2012.

SMALLEY, K. S. M.; APLIN, A. E.; FLAHERTY, K. T.; et al. Meeting report from the 2011 International Melanoma Congress, Tampa, Florida. **Pigment cell & melanoma research**, v. 25, n. 1, p. E1–11, 2012.

SMALLEY, K. S. M.; LIONI, M.; DALLA PALMA, M.; et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 9, p. 2876–83, 2008.

SNOO, F. A. DE; HAYWARD, N. K. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. **Cancer letters**, v. 230, n. 2, p. 153–86, 2005.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138–51, 2003.

SULLIVAN, R. J.; FLAHERTY, K. T. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 49, n. 6, p. 1297–304, 2013.

TAP-, P.; MAEURER, M. J.; GOLLIN, S. M.; et al. Tumor Escape from Immune Recognition. , v. 98, n. 7, p. 1633–1641, 1996.

TENTORI, L.; LACAL, P. M.; GRAZIANI, G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 12, p. 656–66, 2013.

THAKUR, M. DAS; SALANGSANG, F.; LANDMAN, A. S.; et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 251–5, 2013.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]**, v. Chapter 3, p. Unit 3.22, 2006.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569–79, 2002.

THOMAS, N. E. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. **Melanoma research**, v. 16, n. 2, p. 97–103, 2006.

UONG, A.; ZON, L. I. Melanocytes in development and cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 1, p. 38–41, 2010.

VILLANUEVA, J.; INFANTE, J. R.; KREPLER, C.; et al. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. **Cell reports**, v. 4, n. 6, p. 1090–9, 2013.

VLASSOV, A. V; MAGDALENO, S.; SETTERQUIST, R.; CONRAD, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 7, p. 940–8, 2012.

WAN, P. T. C.; GARNETT, M. J.; ROE, S. M.; et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 855–67, 2004.

WARY, K. A Requirement for Caveolin-1 and Associated Kinase Fyn in Integrin Signaling and Anchorage-Dependent Cell Growth. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 625–634, 1998. Elsevier.

XIAO, D.; OHLENDORF, J.; CHEN, Y.; et al. Identifying mRNA, microRNA and protein profiles of melanoma exosomes. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e46874, 2012.

YAUCH, R. L.; DIJKGRAAF, G. J. P.; ALICKE, B.; et al. Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5952, p. 572–4, 2009.