

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

EFEITOS CELULARES E SECREÇÃO DE EXOSSOMOS EM CÉLULAS PANC-1
TRATADAS COM GEMCITABINA

Dissertação de Mestrado

Solon Andrades da Rosa

Porto Alegre, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

EFEITOS CELULARES E SECREÇÃO DE EXOSSOMOS EM CÉLULAS PANC-1
TRATADAS COM GEMCITABINA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Solon Andrades da Rosa

Orientadora: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro
Co-orientadora: Profa. Dra. Patricia Luciana da Costa Lopez

Porto Alegre, 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e nos Laboratórios de Genômica Estrutural e Funcional e Biologia Molecular de Cestódeos, situados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Câncer de pâncreas.....	10
1.1.1 Diagnóstico.....	13
1.1.2 Tratamento	18
1.2 Vesículas Extracelulares	21
1.2.1 Exossomos e câncer de pâncreas	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. CAPÍTULO 1: MANUSCRITO	27
4. DISCUSSÃO	45
5. PERSPECTIVAS	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. CURRICULUM VITÆ resumido.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ADP	adenocarcinoma ductal pancreático
°C	graus Celsius
CAF	cancer-associated fibroblastos
CT	computed tomography
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
ERCP	endoscopic retrograde cholangiopancreatography
EUS	endoscopic ultrasound
EUS – FNA	endoscopic ultrasound – fine needle aspiration
EXO	exossomos
FDA	food and drug administration
g	força da gravidade
GEM	gemcitabina
h	hora
Kg	quilograma
IPMN	intraductal papillary mucinous neoplasm
MCN	mucinous cystic neoplasm
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
MRI	magnetic resonance imaging
ng	nanogramas
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PET	positron emission tomography
RNA	ácido ribonucléico
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrometros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do pâncreas humano, estruturas associadas e citologia.	12
Figura 2: Mecanismos de ação da gemcitabina.	20
Figura 3: Exossomos e microvesículas.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos estágios de desenvolvimento tumoral para tumores de pâncreas.....	17
--	-----------

RESUMO

O câncer de pâncreas é um tipo raro de tumor, mas se apresenta como o sétimo mais letal no mundo. Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) caracteriza 90% dos casos. Possui uma evolução silenciosa e geralmente despercebida. Por isso, os pacientes buscam tratamento apenas em estágios avançados da doença, altamente infiltrada e com potencial metastático. Nesses casos a ressecção cirúrgica é impossível. A opção de tratamento é por via quimioterápica usando gemcitabina (GEM). Muitos casos de resistência a essa droga são registrados. A comunicação entre células tumorais e saudáveis parece ter um papel importante nesse fenômeno. A via de vesículas extracelulares é essencial para a realização dessa comunicação celular. Essas vesículas são estruturas de bicamada lipídica, classificadas por origem e tamanho. Exossomos (EXOs), as vesículas de 40 – 100 nm, formadas a partir de corpos multivesiculares, são caracterizadas por possuírem uma alta gama de moléculas e por sua alta capacidade de penetrância. Em ADP, são descritos como responsáveis por piores prognósticos e formação de nicho metastático. Entretanto seu papel na formação de quimioresistência e resposta inicial à droga permanece pouco explorado. Para investigar alterações em processos de comunicação celular através de EXOs como resposta à GEM nós caracterizamos os efeitos da exposição inicial da linhagem PANC-1 à droga e a liberação de EXOs durante esse tempo. Análises de citometria de fluxo utilizando anexina V, iodeto de propídio e laranja de acridina revelaram que GEM não induz metabolismo de morte, nem fluxo autofágico depois de 24 horas de tratamento com diferentes concentrações da droga. Contudo, GEM induziu alteração no tamanho das células. Utilizando Western blot para marcadores de EXO demonstramos diferenças na abundância das proteínas CD9 e CD54. Como a dose IC_{50} descrita de GEM, 10 μ M demonstrou a mesma variação para ambos marcadores, a mesma foi utilizada nos demais testes. O sobrenadante de células tratadas e não-tratadas foi submetido a ultracentrifugação para isolamento de vesículas. Essas vesículas são EXOs como determinado por microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento dinâmico de luz. Além disso, as células tratadas com 10 μ M de GEM liberaram exossomos diferentes em tamanho, forma e organização, se comparados aos EXOs controle. Além disso, houve aumento na liberação de EXO pelas células tratadas. Como os EXOs mudam em resposta à GEM, é necessário investigar seu conteúdo e propriedades biológicas.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is a rare cancer worldwide, however it is the seventh more lethal. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) comprises 90% of cases. It remains unnoticed due its silencing progression. Therefore, patients seek treatment in a very advanced state, high infiltrate and potentially metastatic. Surgical resection is impossible in most cases. Chemotherapeutic treatment is the remaining option, through gemcitabine (GEM). There are a lot of chemoresistant cases well described in literature. Cell communication between tumor and healthy cells appears to play an important role in this process. Extracellular vesicles pathway is essential in cell to cell communication. Those vesicles are double layer lipidic structures, classified by its origin and size. Exosomes (EXOs), vesicles ranging from 40 – 100 nm, and formed from multivesicular bodies, are reported as carrying a wide variety of molecules and with high penetrant capability. For PDAC, they are described as responsible for bad progressions and metastatic niche formation. However, their role during chemoresistant phenotype initiation, and initial response to drug contact remains little explored. To investigate possible changes in cell communication through EXOs as a response to GEM, we characterized PANC-1 initial response to drug and analyzed EXOs released during this time. Flow cytometry analyses using Annexin V, propidium iodide and acridine orange revealed that GEM do not induce death phenotype after 24 hours treatments with different concentrations, neither autophagic metabolism. However, GEM induces size increase in treated cells. *Western blot* analysis for EXO markers revealed changes in cellular abundance of CD9 and CD54. As IC_{50} reported 10 μ M GEM concentration showed the same variation on protein abundance for these markers, it was used as treatment. Treated and untreated cells supernatants were ultracentrifugated for vesicles isolation. The vesicles obtained were confirmed as EXO by transmission electron microscopy and dynamic light scattering. Also 10 μ M GEM treated cells exosomes, revealed to be smaller, different in shape and organization compared to vehicle treated exosomes. Moreover, treated cells EXOs increased concentration as response to GEM exposure. As EXOs change in response to GEM treatment, further investigation is needed to determine its cell changing capabilities.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pâncreas

Apesar de ser considerado um tipo raro de câncer (14º em incidência na população mundial), o câncer de pâncreas apresenta uma elevada taxa de mortalidade (7º tumor mais letal mundialmente) (WHO, 2018). Os tumores de pâncreas seguem este padrão principalmente entre os países mais desenvolvidos, o que demonstra que fatores ambientais e de padrão de vida têm uma forte influência sobre a doença. No Brasil, o câncer de pâncreas segue o mesmo tipo de distribuição, sendo o 10º tumor em incidência e o 6º em letalidade (Mcguigan *et al.*, 2018; INCA, 2018; WHO, 2018).

A alta taxa de mortalidade associada a um tumor considerado raro deve-se à evolução rápida e silenciosa da doença, bem como às dificuldades no diagnóstico, tanto por problemas nas técnicas de monitoramento e identificação da doença, bem como por sintomas facilmente confundíveis com outras patologias (Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013). Tais fatores levam à descoberta de tumores de pâncreas em estágios avançados, normalmente inoperáveis e metastáticos, o que combinados à baixa eficácia das drogas hoje conhecidas para o tratamento dessa enfermidade, levam à uma taxa de sobrevida de 5 anos de apenas 2-9%. O diagnóstico precoce ainda permanece a principal barreira a ser ultrapassada para atingir melhores desfechos aos pacientes (Kandel & Wallace, 2018; Mcguigan *et al.*, 2018).

Os tumores de pâncreas se apresentam em 90% dos casos como adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), com origem no epitélio do ducto pancreático. Outros tipos de tumores de origem exócrina e endócrina compõem os demais casos da doença, os quais são considerados extremamente raros. Esses, são classificados como: carcinomas de células acinares, carcinomas adenoescamosos, carcinomas colóides e hepatóides, neoplasma mucinoso intraductal papilar, neoplasma mucinoso cístico, neoplasia intraepitelial pancreática, pancreatoblastoma, cisteadonoma seroso, carcinoma de células do anel de sinete, neoplasma sólido-pseudopapilar, carcinomas indiferenciados, carcinomas indiferenciados com células gigantes osteoclasto e tumores neuroendócrinos (Kanji & Gallinger, 2013; Johns Hopkins Medicine, 2018; Mcguigan *et al.*, 2018). As patologias não-ADP, compreendem um grupo de doenças muito singulares, com evoluções

moleculares específicas e tratamentos muito direcionados e que acometem um pequeno número de pacientes. Apesar de importantes, os tumores não-ADP, não serão consideradas neste trabalho, uma vez que o ADP acomete uma maior porcentagem de pacientes e possui em proporção o maior número de casos avançados e com baixa sobrevida (DePinho & Bardeesy, 2002; Bosman, Carneiro & Hruban, 2018).

No caso dos ADPs, a localização dos tumores iniciais se dá em diferentes porções do órgão e por isso apresentam diferentes desfechos clínicos, bem como sintomas específicos e possibilidades de tratamento únicas. Os tumores localizados na região da cabeça do pâncreas compõem cerca de 60 – 70% dos casos da doença e possuem uma melhor possibilidade de ressecção devido à sua localização no abdômen e consequentemente, um melhor prognóstico (Fig. 1). Os demais ADPs se dividem em 15% na região da cauda e 15% na região do corpo do pâncreas, sendo esses tumores de mais difícil acesso, bem como de piores prognósticos (Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013; McGuigan *et al.*, 2018). No entanto, no momento do diagnóstico, cerca de 80% dos pacientes apresenta tumores inoperáveis que já se disseminaram por todo o órgão e não pouco comumente, apresentam crescimento metastático em órgãos associados (Kanji & Gallinger, 2013).

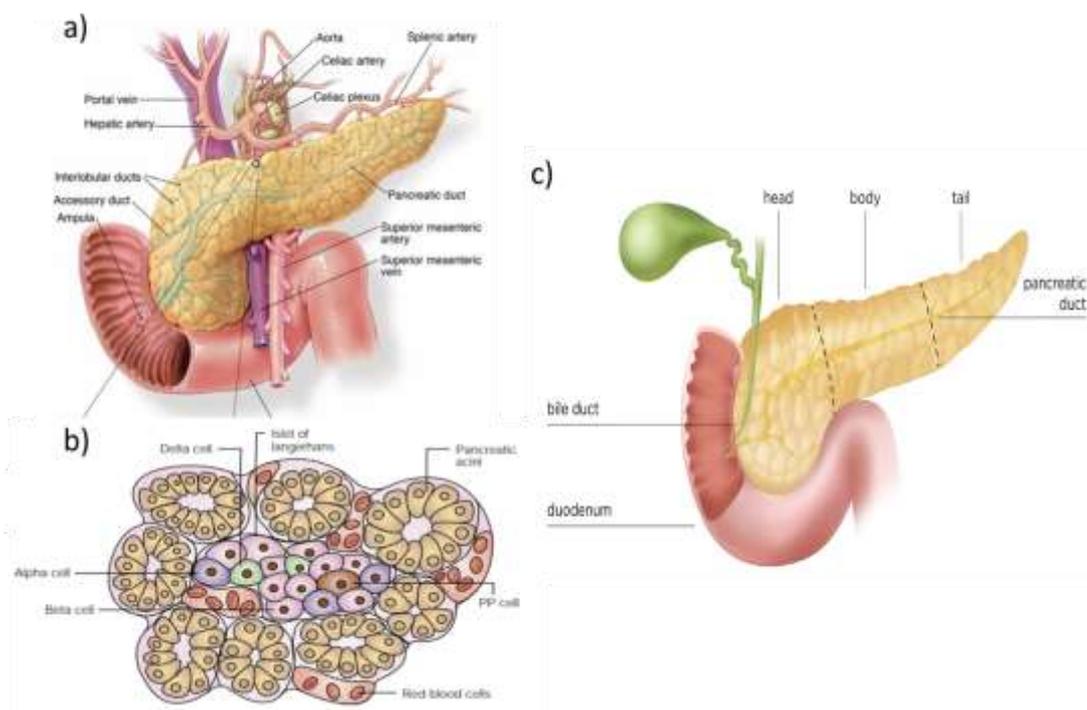


Figura 1: Anatomia do pâncreas humano, estruturas associadas e citologia. a) Localização pancreática e órgãos associados. b) Citologia do pâncreas. c) Divisão anatômica do órgão. Adaptado de DePinho & Bardeesy (2002); Muniraj, Jamidar & Aslanian (2013); Hirshberg Foundation (2018).

A grande quantidade de pacientes que apresenta doença avançada deve-se tanto ao diagnóstico tardio, quanto aos sintomas que frequentemente são inespecíficos. O câncer de pâncreas é considerado raro e normalmente não adicionado ao *screening* de pacientes, apenas em casos de risco familiar, idade avançada e pacientes já diagnosticados com cistos (Moutinho-Ribeiro *et al.*, 2017; Mcguigan *et al.*, 2018).

O câncer de pâncreas se apresenta assintomático em estágios iniciais de desenvolvimento, o que impede muitas vezes o diagnóstico precoce. Uma vez que os sintomas começam a se manifestar, alguns deles podem dar indício da localização do tumor no órgão. Geralmente tumores localizados na cabeça do órgão causam obstrução biliar, devido à pressão anatômica sobre os dutos biliares (De La Cruz, Young & Ruffin, 2014). Tumores localizados no corpo e na cauda do pâncreas geralmente são associados à perda de peso súbita e inexplicada. Sintomas comuns são a icterícia, dor abdominal, prurido, urina escura, anorexia, náusea e depressão. Qualquer desses sintomas acompanhado de diabetes tipo 2 súbita, é um forte indício de tumor pancreático (Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013).

Alguns fatores de risco estão associados ao desenvolvimento da doença. Os mesmos são divididos em não modificáveis e modificáveis, sendo esta classificação baseada em fatores genéticos e não controláveis e fatores ambientais/comportamentais alteráveis, respectivamente.

Dentro do grupo dos fatores não modificáveis estão: idade, tumores de pâncreas aparentemente aparecem a partir dos 40 anos; gênero, mais comuns em homens; grupo étnico, mais comum entre negros; tipo sanguíneo, mais típico dos tipos sanguíneos AB, B ou A (Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013; McGuigan *et al.*, 2018). A microbiota oral parece ter um importante papel na patologia da doença, encontrada elevada para alguns tipos bacterianos em pacientes oncológicos de pâncreas. Histórico familiar com predisposição a tumores pancreáticos também eleva o risco para a doença em cerca de 9 vezes, principalmente para aqueles indivíduos com casos na família de mutações nos genes BRCA1, BRCA2, MMR, entre outros. Diabetes tipo 2 também é um conhecido fator pré-tumoral.

Os fatores modificáveis são aqueles associados a padrões de comportamento e hábitos de vida que podem ser alterados. No entanto, uma vez exposto a qualquer um desses fatores, o indivíduo aumenta seu risco de câncer de pâncreas muitas vezes, mesmo modificando tal hábito (Moutinho-Ribeiro *et al.*, 2017; McGuigan *et al.*, 2018). Consumo de tabaco e álcool possuem dados mistos na literatura sobre seu efeito no desfecho de pacientes com tumores de pâncreas. Porém na maioria dos casos parece haver uma correlação positiva entre os pacientes oncológicos e essas duas drogas. Obesidade e fatores dietários parecem elevar e muito o risco de tumores pancreáticos. Dietas ricas em açúcar, carne vermelha e alto teor de gordura apresentam-se como grupo de risco. Além disso, pancreatite crônica e infecções do pâncreas e trato gastrointestinal frequentes e consecutivas, como por exemplo, *Helicobacter pylori* e hepatite C, levam a formação de lesões pancreáticas que podem evoluir para tumores.

1.1.1 Diagnóstico

Dada a existência de pequenos grupos de risco, bem como fatores que podem levar ao desenvolvimento de tumores pancreáticos e alguns sintomas que podem indicar a presença de neoplasias ductais, faz-se o uso principalmente de ferramentas de diagnóstico

por imagem para a identificação de possíveis danos e estruturas incomuns na morfologia do pâncreas (Kanji & Gallinger, 2013; Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013; Moutinho-Ribeiro *et al.*, 2017; McGuigan *et al.*, 2018). No entanto, tais técnicas apresentam um impedimento anatômico quando utilizadas. O pâncreas é uma pequena estrutura localizada no centro do abdômen, envolto por vários órgãos grandes e densos (fígado, vesículas, intestinos, etc.) e por si só é uma estrutura muito sólida pouco enervada e vascularizada. Assim, pequenas alterações de estrutura passam despercebidas aos olhos dos radiologistas, bem como massas densas e localizadas em pontos “cegos” podem afetar o laudo. Além disso, o conjunto de sintomas comuns aos tumores de pâncreas e a pancreatites, associados a raridade da doença, levam a uma tendência no momento do diagnóstico, muitas vezes levando ao laudo errôneo de pancreatite sobre tumores pancreáticos, tornando esta etapa uma das que mais necessita de avanços e atenção (Fogel *et al.*, 2017; Kandel & Wallace, 2018).

A técnica mais utilizada entre as ferramentas de diagnóstico por imagem disponíveis é a tomografia computadorizada (CT, do inglês *computed tomography*). No entanto, diversas alterações ao protocolo padrão de CT são aplicadas a fim de superar as barreiras físicas e anatômicas do órgão (Tyang *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017). Inicialmente, uma rápida injeção de contraste com iodo deve ser feita e várias pós- e pré- aquisições de imagens são realizadas, a fim de revelar as veias e artérias. O contraste neutro com água auxilia na visualização de bordas da estrutura e de órgãos ligados, como o intestino. Reconstruções de diferentes eixos e ângulos, não comuns na rotina auxiliam na formulação de imagens mais claras. Tais modificações são chamadas de protocolo pancreático (Kandel & Wallace, 2018).

Outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (MRI, do inglês *magnetic resonance imaging*) auxiliam na complementação do diagnóstico, mas não são consideradas tão sensíveis quanto a CT. A utilização das mesmas se dá principalmente em situações em que o paciente é alérgico aos contrastes usados na CT. Nesse caso o uso de contraste com gadolínio auxilia na aquisição das imagens, mas pode levar a algumas complicações (Kandel & Wallace, 2018). A MRI operada no modo colangiopancreatografia pode auxiliar em reconstruções mais exatas (McGuigan *et al.*, 2018).

O ultrassom abdominal é muito útil em casos onde o tumor é menor que 2 cm, assim como o PET (do inglês, *positron emission tomography*), os quais, podem levar ao complemento do diagnóstico. No entanto, a técnica mais sensível é o ultrassom endoscópico (EUS do inglês, *endoscopic ultrasound*) (Kandel & Wallace, 2018). Através de um pequeno transdutor, imagens muito detalhadas são obtidas por vias endoscópicas e revelam pequenas alterações que acabam passando despercebidas pelos exames menos invasivos. O acoplamento de uma pequena agulha EUS-FNA (do inglês, *endoscopic ultrasound-fine needle aspiration*) que permite a biópsia de uma pequena porção do local é considerada a técnica mais sensível para a detecção e estagiamento de possíveis lesões encontradas (Yabar & Winter, 2016; McGuigan *et al.*, 2018).

Com uma amostra de tecido biopsiada é possível determinar a malignidade do tumor e caracterizar as lesões encontradas.

Existem uma série de lesões pré-malignas de pâncreas muito bem descritas molecularmente, de acordo com o conjunto de mutações que leva à sua formação e que possuem tratamentos específicos e desfechos bem caracterizados (Maitra *et al.*, 2005; Ottenhof *et al.*, 2011). Detectar as lesões pré-malignas é crucial para o desfecho dos pacientes e possibilita uma sobrevida maior e um tratamento menos doloroso. Porém, essas neoplasias geralmente são assintomáticas e comumente confundidas com outras patologias (McGuigan *et al.*, 2018).

O IPMN (do inglês, *intraductal papillary mucinous neoplasm*) traduzido como neoplasma mucinoso papilar intraductal, é o tipo de lesão menos comum, embora muito bem caracterizado. Sua classificação deriva em vários subtipos de acordo com a localização do tumor e idade do paciente (Singh & Maitra, 2007). A principal mutação encontrada no IPMN está localizada no gene GNAS e esse tipo de lesão possui uma tendência a evoluir para casos invasivos malignos. Uma vez detectada, tal lesão é considerada de bom prognóstico pois permite o tratamento precoce e desfechos mais controlados. O IPMN se caracteriza pelo crescimento de pequenas pápulas com secreção mucinosa (Ottenhof *et al.*, 2011; McGuigan *et al.*, 2018).

A PanIN (do inglês, *pancreatic intraepithelial neoplasia*) traduzido como neoplasia intraepitelial pancreática é o tipo mais comum de lesão pré-maligna, bem caracterizado e descrito (Maitra *et al.*, 2005). Formado por pequenos crescimentos de células disformes nos ductos pancreáticos, as PanINs possuem uma evolução molecular

detalhada e comum em 90% dos casos. A principal mutação detectada nessas lesões é no gene KRAS. A evolução natural das PanINs é de tumores com malignidade média, no entanto, seu crescimento é o mais comumente confundido com pancreatite, devido aos poucos ou quase nulos sintomas e a formação de pequenas lesões, dificilmente detectáveis via MRI, PET e CT. As PanINs são classificadas de 1 a 3 de acordo com o tipo de lesão e mutações associadas (Ottenhof *et al.*, 2011; Moutinho-Ribeiro *et al.*, 2017).

O MCN (do inglês, *mucinous cystic neoplasm*) traduzido como neoplasma cístico mucinoso é o tipo mais raro de lesão. Caracterizam-se por serem pequenos cistos septados sem comunicação com os dutos pancreáticos e com acúmulo de secreção mucinosa no seu interior (Singh & Maitra, 2007). Sua forma de ovário característica facilita a identificação se comparada a outras lesões, no entanto, sua evolução molecular é a menos definida, com mutações em vários genes, sem um padrão definido ocorrendo em vários casos. Os MCNs tipicamente ocorrem em porções da cauda e corpo do pâncreas e quando detectados na cabeça, são sinais de evoluções malignas dos tumores (Moutinho-Ribeiro *et al.*, 2017).

Uma vez biopsiada a amostra permite determinar o estadiamento do tumor de acordo com a *American Joint Committee on Cancer*, a partir do qual se determinam as possíveis linhas de tratamento (Tabela 1), variando de ressecção cirúrgica (Ia-IIa) a tratamento paliativo (IIb-IV) (Muniraj, Jamidar & Aslanian, 2013; Yabar & Winter, 2016).

Tabela 1: Classificação dos estágios de desenvolvimento tumoral para tumores de pâncreas. De acordo com o tamanho da lesão e sua infiltração em áreas associadas ao pâncreas, classifica-se o desenvolvimento tumoral entre 6 estágios possíveis. Fonte: Yabar & Winter, 2016.

TNM pancreatic cancer staging system	
T categories	
Tis	Carcinoma in situ
T1	Mass <2 cm, confined to the pancreas
T2	Mass >2 cm, still confined to the pancreas
T3	Mass that extends beyond the pancreas
T4	Mass invades visceral arteries (ie, locally advanced)
N categories	
N0	No affected lymph nodes
N1	Regional lymph node metastases
M categories	
M0	No evidence of metastases
M1	Distant metastases
Stage grouping for pancreatic cancer^a	
Stage 0	Tis, N0, M0
Stage IA	T1, N0, M0
Stage IB	T2, N0, M0
Stage IIA	T3, N0, M0
Stage IIB	T1-3, N1, M0
Stage III	T4, any N, M0
Stage IV	Any T, any N, M1

^a Information from the American Joint Committee on Cancer 7th edition TNM staging system.⁵¹ Used with permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media.

Biomarcadores não baseados em diagnóstico por imagem e menos invasivos já estão disponíveis para o diagnóstico do ADP, embora não suficientes para detecção e caracterização das lesões.

O antígeno sérico 19-9 (CA 19-9) é o único biomarcador aprovado pelo FDA. No entanto, o mesmo possui uma baixa taxa de positividade não sendo útil para *screenings* populacionais, apenas para acompanhamento do tratamento e evolução das lesões. O mesmo é detectado através de espectrometria de massas de metabólitos pancreáticos (Ansari, Gustafsson & Andersson, 2015).

A alta taxa de mutações existentes em todas as lesões de adenocarcinoma também serve como biomarcador da doença. Sequenciamento de DNA livre circulante no sangue e em secreções pancreáticas pode levar a *insights* sobre lesões e detectar previamente tumores em formação. No entanto, tais técnicas ainda permanecem com baixa sensibilidade (Kanda *et al.*, 2016; Riva *et al.*, 2016).

A análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs do inglês, *volatile organic compounds*) permanece em estudo para futuras aplicações. Seu uso em ar exalado facilitaria a detecção de tumores de forma pouco invasiva (McGuigan *et al.*, 2018).

1.1.2 Tratamento

O tratamento utilizando ressecção cirúrgica é utilizado como primeira linha de combate para tumores pancreáticos. A ressecção completa é garantia de cura para os pacientes. No entanto, dado o estágio avançado da maioria dos tumores de pâncreas no momento do diagnóstico, poucos pacientes tem a chance de uma cura completa via ressecção e passam por procedimentos cirúrgicos que diminuem a massa tumoral e permitem sucesso em tratamentos secundários (Yabar & Winter, 2016). Em estágios muito avançados do tumor, no caso de infiltração em vasos sanguíneos, órgãos próximos ou metástase, a opção cirúrgica se torna inviável, uma vez que os tumores não seriam retirados e a razão benefício/efeitos adversos diminui drasticamente (Fogel *et al.*, 2017).

O objetivo da ressecção cirúrgica é alcançar uma margem de ressecção do tipo R0 (sem evidência macroscópica de tecido tumoral durante a cirurgia, sem evidência microscópica dada a análise patológica do tecido pós-cirurgia e sem evidência de infiltrado via CT – 1 mm). Tal tipo de operação possui uma baixa taxa de mortalidade 5%, no entanto, possui cerca de 60% de morbidade, com uma série de problemas e complicações decorrentes da cirurgia, uma vez que a retirada de tecido pancreático é altamente invasiva (Kanji & Gallinger, 2013; Buanes, 2017). A maioria dos casos cirúrgicos de pâncreas chega a ressecções do tipo R1 (sem evidência macroscópica de tecido tumoral durante a cirurgia, mas com evidência microscópica de infiltrado tumoral dentro da margem de ressecção de 1 mm) (Hackert, Schneider & Büchler, 2015). Os casos mais avançados onde a cirurgia ainda é recomendável chegam a ressecções do tipo R2 (evidência macroscópica de tecido tumoral não-operável). No entanto, nesses casos a cirurgia geralmente traria mais complicações do que benefícios e o tratamento segue na forma paliativa (Isaji *et al.*, 2018)

Os procedimentos cirúrgicos utilizados para ressecção são colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (ERCP, do inglês *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*), pancreatoduodenotomia, pancreatoduodenotomia distal e ressecções vasculares (Mcguigan *et al.*, 2018).

A técnica de ERCP é utilizada tanto como forma de diagnóstico quanto forma de cirurgia endoscópica pouco invasiva. Consiste na endoscopia combinada a contrastes e CT, permitindo uma visualização de todas as estruturas pancreáticas e permite pequenos procedimentos como a retirada de bloqueios, biópsias e pequenos tumores dos dutos pancreáticos (Kanji & Gallinger, 2013). A pancreatoduodenectomia também chamada de procedimento de Whipple, consiste na retirada de porções do tecido pancreático principalmente na região da cabeça e também de órgãos associados ao tumor como intestino e estômago, por exemplo (Hackert, Schneider & Büchler, 2015). O procedimento aplicado nas regiões da cauda e corpo do pâncreas se chama pancreatoduodenectomia distal. Além disso, ressecções vasculares e arteriais são recomendadas para a retirada de infiltrados nos vasos e com isso permitir a maior chance de uma ressecção do tipo R0 (Isaji *et al.*, 2018).

Em casos em que não é possível a ressecção cirúrgica ou que o estado de evolução tumoral é avançado, porém ainda operável, a quimioterapia é utilizada como tratamento principal, adjuvante ou neoadjuvante. O principal quimioterápico utilizado em tumores pancreáticos é a gemcitabina (Yabar & Winter, 2016; Fogel *et al.*, 2017; Mcguigan *et al.*, 2018).

A gemcitabina foi estabelecida em 2007 para o tratamento de tumores pancreáticos, sendo considerada o quimioterápico com melhores resultados, bem como com menores efeitos colaterais ao paciente (Eckel & Schmid, 2007). A gemcitabina funciona através do mecanismo de análogo de nucleosídeo, sendo incorporada durante a replicação do DNA em substituição aos nucleotídeos convencionais. Após sua incorporação, a DNA-polimerase ainda é capaz de adicionar mais um nucleotídeo à cadeia nascente. No entanto, após tal evento, a estrutura da gemcitabina mais nucleotídeo resulta em impedimentos estéricos à DNA polimerase, cessando a replicação e impedindo a excisão de nucleotídeos via atividade de exonuclease 3' -> 5' (mecanismo denominado *Masked Chain Termination*) (Fig. 3) (Gesto *et al.*, 2012). Mecanismos secundários relacionados ao metabolismo da droga também garantem sua absorção e funcionamento. Um dos produtos metabólicos da absorção da gemcitabina é a gemcitabina difosfato (dFdCDP), que atua diretamente sobre a enzima ribonucleotídeo redutase, pela ligação covalente ao sítio ativo da enzima. Assim, a síntese dos nucleotídeos comuns acaba sendo

afetada, diminuindo seu *pool* e permitindo que a gemcitabina seja facilmente incorporada durante a síntese de DNA (De Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014).

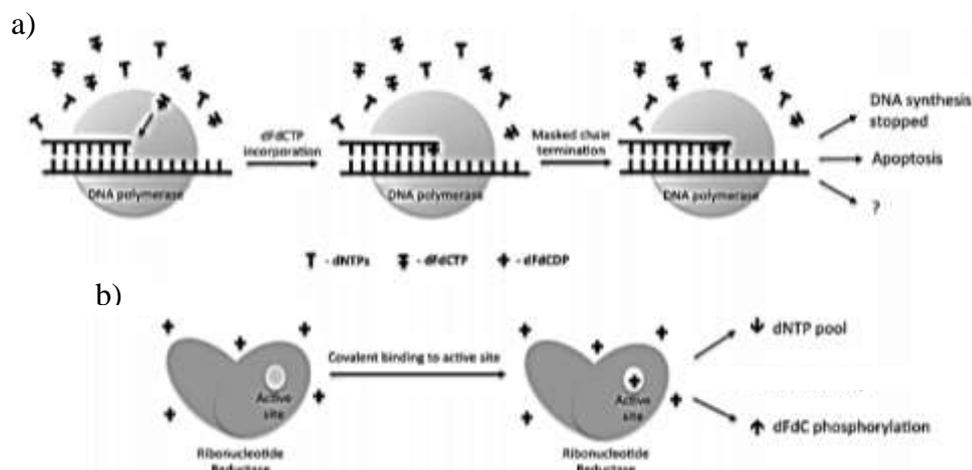


Figura 2: Mecanismos de ação da gemcitabina. a) *Masked chain termination*. b) Ação sobre a ribonucleotídeo redutase. dFdCTP = gemcitabina trifosfato. dFdCDP = gemcitabina difosfato. dFdC = gemcitabina. Adaptado de De Sousa Cavalcante & Monteiro (2014).

Apesar de ser o principal quimioterápico utilizado no tratamento do ADP, muitos trabalhos e protocolos de tratamento utilizam combinações de gemcitabina com outros quimioterápicos de diferentes classes e mecanismos de ação, buscando melhoras no desfecho final do paciente (Mcguigan *et al.*, 2018). Quimioterápicos comumente utilizados em combinação com gemcitabina são 5-Fluoracil, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina, erlotinib e paclitaxel. (Fiteni *et al.*, 2014; De Sousa Cavalcante e Monteiro 2014; Yabar & Winter, 2016; Fogel *et al.*, 2017)

O tratamento dos pacientes metastáticos é feito principalmente através de um regime de combinação de quatro drogas chamado FOLFIRINOX. O regime consiste em combinar as drogas 5-Fluoracil, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina aumentando significativamente a expectativa de vida de 6 meses em 79,7%. No entanto, tal combinação traz efeitos adversos graves ao estado de saúde do paciente (Yabar & Winter, 2016; Fogel *et al.*, 2017; Tong *et al.*, 2018)

A radioterapia tem sido utilizada na forma de tratamento neoadjuvante, antes da quimioterapia principal ou do tratamento cirúrgico. Alguns estudos demonstram que tal

combinação permite um melhor desfecho para o tratamento principal (Fogel *et al.*, 2017; Mcguigan *et al.*, 2018).

1.2 Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares desempenham um papel fundamental em processos celulares diversos, sendo responsáveis pela comunicação intercelular específica e inespecífica, a curto, médio e longo alcance (Colombo, Raposo & Théry. 2014). Todos os seres vivos secretam vesículas extracelulares como forma de comunicação, seja dentro de um organismo multicelular, seja em comunidades (biofilmes, simbioses, etc) compostas de diferentes organismos ou organismos unicelulares (Ståhl *et al.*, 2019).

As vesículas extracelulares são responsáveis pelo envio de diversos tipos de moléculas ao meio exterior, variando de DNAs a proteínas, lipídios, metabólitos, RNAs, organelas, entre outros (Szatanek *et al.*, 2017). Isso ocorre pois, dependendo da vesícula em questão e da situação metabólica celular, o empacotamento de moléculas independe de vias complexas de sinalização e marcações via sinais bioquímicos, sendo pura e simplesmente um processo de invaginações de membrana. Logicamente, existe também um processo muito bem controlado de endereçamento de componentes na formação das vesículas (Juan & Fürthauer, 2018).

Existem muitas classificações para as vesículas extracelulares. O consenso é de que todas são produtos do metabolismo de células formada por bicamadas lipídicas (Colombo, Raposo & Théry. 2014). A nomenclatura para os diversos tipos de vesículas extracelulares também é fortemente revisada na literatura específica. Pelo fato das vesículas serem encontradas em todos os fluidos biológicos, muito antes de se estabelecer alguma convenção para classificação e nomenclatura, as vesículas extracelulares receberam nomes de acordo com o material de onde eram isoladas, como por exemplo oncossomos (Hauser, Wang & Didenko, 2017). Atualmente, existe um certo consenso entre os pesquisadores da área de classificar as vesículas de acordo com seu tamanho e biogênese (Hessvik & Llorente, 2018). Nesse sentido, existem três grandes categorias de vesículas extracelulares: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (Fig. 3).

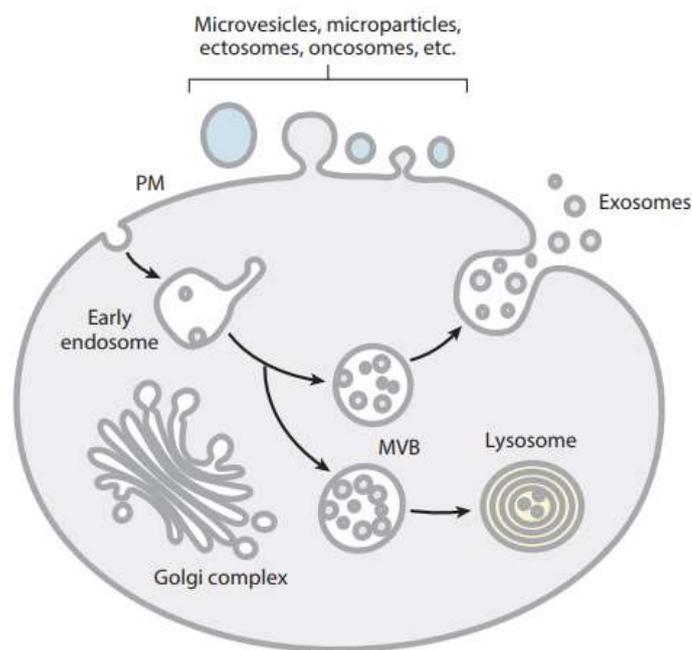


Figura 3: Exossomos e microvesículas. Processo de biogênese de exossomos (gênese intracitoplasmática) (30-100 nm) e microvesículas (gênese de partes de membrana) (200-1000 nm). MVB, *multivesicular body*. PM, *plasmatic membrane*. Fonte: (Colombo, Raposo & Théry. 2014).

Os exossomos são as menores vesículas secretadas pelas células vivas. Seu tamanho varia de 30 – 100 nm de diâmetro, sendo esta característica ainda fonte de debate entre os cientistas. Sua gênese passa por processos de sinalização que envolvem invaginações da membrana plasmática formação de corpos multivesiculares citoplasmáticos, absorção de moléculas, cascatas de sinalização que levam a separação desses corpos em lisossomos e exossomos e posterior liberação via exocitose (Colombo, Raposo & Théry. 2014). Sua absorção nas células de destino se dá por fusão a proteínas de membrana, específicas ou inespecíficas e endocitose. Dentre as vesículas extracelulares, os exossomos são as descritas com uma maior variedade de moléculas em seu interior. Seu pequeno tamanho garante a esse tipo de vesícula características especiais, como a capacidade de adentrar sítios imunoprotégidos e ultrapassar a barreira hematoencefálica (Hessvik & Llorente, 2018; Juan & Fürthauer, 2018).

As microvesículas possuem escala micrométrica variando de 200 – 1000 nm, classificação também ainda em debate. Sua gênese se dá por processos de brotamento de membrana, através de vias de sinalização que levam a formação de evaginações na superfície da célula e carregam as proteínas de membrana próximas localizadas na

membrana plasmática (Colombo, Raposo & Théry, 2014). Metabólitos próximos também podem ser carregados nesse processo. São descritas com um elevado número de moléculas em seu interior, no entanto, com uma menor variedade que os exossomos. Por outro lado, por constituírem brotamentos de membrana, possuem uma gama muito maior de receptores de superfície (Juan & Fürthauer, 2018).

Os corpos apoptóticos são resultado de processos de morte celular. Seu tamanho é considerado superior aos 1000 nm. Apesar de serem resultado de processos de morte celular, os corpos apoptóticos carregam dentro de si muitas informações capazes de alterar o metabolismo de células vizinhas. Seu conteúdo é variado e podem possuir fragmentos do núcleo, ricos em cromatina ou citoplasma, rico em organelas, com conteúdo podendo ser controlado pela célula em morte, de maneira organizada (Szatanek *et al.*, 2017). Essa diferenciação de conteúdo divide os corpos apoptóticos em citoplasmáticos ou nucleares. Por serem produtos de metabolismo de morte celular via apoptose, muitas vezes os corpos maiores se dividem em pequenas vesículas menores, chamadas de micropartículas apoptóticas ou bolhas apoptóticas. Nesse caso, os corpos apoptóticos passam a existir na faixa de tamanhos que compreende exossomos e microvesículas, variando de 50 – 5000 nm. Contudo sua gênese relacionada à morte celular faz com que essas vesículas não possam ser agrupadas com as demais, pois possuem propriedades de sinalização diferentes (Hauser, Wang & Didenko, 2017).

1.2.1 Exossomos e câncer de pâncreas

Nos últimos anos os exossomos tem ganhado foco pela sua comprovada participação em processos patológicos, bem como pela sua estrutura e biogênese com objetivos em pesquisa aplicada (El Andaloussi *et al.*, 2013; Maas, Breakefield & Weaver, 2017; Castro-Marrero *et al.*, 2018).

Por participarem de processos de sinalização intercelular, os exossomos têm sido descritos contendo um variado número de moléculas, nos mais diversos tipos de patologias, desde doenças neurodegenerativas, infecciosas, autoimunes, câncer, entre outras (Pomatto *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Caruso Bavisotto *et al.*, 2019; Ståhl *et al.*, 2019).

Seu papel em tumores é crucial, desde o momento do estabelecimento das neoplasias, formação, crescimento, estabelecimento do microambiente e até a resistência a tratamentos (Robinson *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2017; Massoumi *et al.*, 2019). As células mutadas que dão origem a tumores se utilizam desse mecanismo de comunicação intercelular para recrutar células que não participam do processo tumoral, bem como para afetar o funcionamento do sistema imune e modular as células vizinhas a fim de criar um ambiente favorável ao crescimento do tumor. Além disso, muitos são os casos de resistência tumoral à drogas utilizadas em tratamentos quimioterápicos com comprovada participação exossomal (Jin, Wu & Tan, 2016; Wei *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018; Yan, Fu & Ming, 2018). Alguns trabalhos demonstram inclusive papel principal de exossomos na infiltração tumoral e estabelecimento de metástases (Becker *et al.*, 2016). Assim como os exossomos são agentes em todos esses processos, investiga-se também a possibilidade de os mesmos funcionarem como biomarcadores, tanto para o acompanhamento tumoral quanto para diagnóstico precoce, uma vez que carregam moléculas específicas das células de origem e seu conteúdo é heterogêneo, altamente dependente do momento metabólico da célula (Nuzhat *et al.*, 2017; Tai *et al.*, 2018).

No caso específico de tumores pancreáticos, existem uma série de trabalhos que demonstram a participação de exossomos derivados de ADPs em piores desfechos tumorais (Charrier *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Masamune *et al.*, 2018). A principal participação dos exossomos se dá na formação de um nicho pré-metastático, onde os exossomos derivados do tumor assumem um papel de mensageiros iniciais do estabelecimento de metástases. Sua função é regular o ambiente no qual a metástase será inserida, criando um suporte tecidual e preparando as futuras células vizinhas da metástase para o seu estabelecimento (Costa-Silva *et al.*, 2015; Yan, Fu & Ming, 2018). Um segundo papel desempenhado pelos exossomos está relacionado à súbita perda de peso recorrente em pacientes com tumores pancreáticos avançados. Artigos demonstram que alguns exossomos pancreáticos contêm adrenomedulina, molécula que afeta a produção de insulina via inibição das células beta pancreáticas e promove lipólise do tecido adiposo associado (Jin, Wu & Tan, 2016; Nuzhat *et al.*, 2017).

Muitos pacientes de adenocarcinoma pancreático também apresentam uma alta taxa de quimiorresistência tanto para a terapia adjuvante com gemcitabina quanto para a droga como forma de tratamento principal. Relatos de miRNAs associados a resistência a drogas

em exossomos derivados de ADPs são comuns (Wei *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018). Além disso, tais exossomos podem ser utilizados como sinalizadores para células que suportam o ambiente tumoral, como os fibroblastos associados ao câncer (CAFs do inglês, *cancer-associated fibroblasts*) (Jin, Wu & Tan, 2016).

Sabe-se que os exossomos possuem papel crucial desde o momento inicial da formação tumoral, além de carregarem informações sobre as células tumorais durante toda a existência e manutenção do tumor (Jin, Wu & Tan, 2016). Além disso, muitos trabalhos determinam que tumores alteram o conteúdo dessas vesículas em resposta direta ao estresse quimioterápico, podendo levar à quimioresistência tumoral (Zhou *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2016; Batista & Melo, 2019). Entretanto, para ADP, faltam trabalhos que explorem a biologia básica de resposta das células em um primeiro contato com gemcitabina e os efeitos iniciais dessa interação, no campo da comunicação intercelular através de vesículas. Explorar tal campo pode revelar mecanismos pelos quais a resistência tumoral se estabelece, bem como aspectos básicos do metabolismo secretório de ADP. Tais observações podem auxiliar em ferramentas de diagnóstico precoce, monitoramento e manejo dos pacientes e ajudar a superar assim os principais problemas envolvidos no câncer de pâncreas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta celular e a secreção de exossomos da linhagem celular de adenocarcinoma ductal pancreático PANC-1 exposta ao quimioterápico gemcitabina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Estabelecer uma curva dose-resposta a gemcitabina;
- B) Avaliar efeitos celulares em resposta à droga;
- C) Determinar a expressão de marcadores de exossomos em resposta ao tratamento com diferentes doses de gemcitabina;
- D) Isolar vesículas extracelulares secretadas por células PANC-1 na presença e ausência da droga;
- E) Caracterizar as vesículas isoladas quanto ao tipo, de acordo com o tamanho e a biogênese.

1
2 **3. CAPÍTULO 1: MANUSCRITO**

3
4 Manuscrito em elaboração para a revista BJ Cancer, como substituição aos itens
5 Resultados e Materiais e Métodos.
6

7
8
9
10
11
12
13 **Title: GEMCITABINE EFFECTS ON PANCREATIC CELLS AND**
14 **EXOSOME RELEASE**

15 **Running title: Gemcitabine effects over PANC-1 and exosomes**

16
17 da Rosa, S. A¹; Lopez, PLC²; Monteiro, KM³.
18

19 1 - Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio
20 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil

21 2 – Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 90035-003,
22 Brazil.

23 3 - Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio
24 Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil
25

26 *Corresponding author at: Av. Bento Gonçalves 9500, bld. 43421, 91501-970 Porto Alegre, Brazil.

27 Tel.: +5551 3308 7768. karina@cbiot.ufrgs.br
28
29

30 Abstract

31

32 **Background:** Although not a common tumor, pancreatic cancer is one of the most lethal
33 cancers. Unnoticed by its silencing progression, patients seek treatment in advanced stages,
34 making surgical resection impossible. Gemcitabine is the second option. Chemoresistance is well
35 reported in these cases. Unfortunately, cell communication processes are not fully investigated, and
36 could be the mechanism to resistance. In cell communication literature, exosomes are the main
37 vesicles explored.

38 **Methods:** To investigate exosomes release PANC-1 cells were treated with different gemcitabine
39 doses for 24 hours. Cellular effects were analyzed. Vesicles at supernatant were collected from
40 treated and untreated cells, through ultracentrifugation. Vesicles were characterized using
41 transmission electron microscopy and dynamic light scattering.

42 **Results:** The treated cells showed a morphology change, but not apoptotic or necrotic death,
43 neither autophagic metabolism. Exosomes markers showed decrease and 10 μM was the chosen
44 dose for investigation. Vesicles were confirmed as exosomes. After gemcitabine exposure,
45 exosomes released by cells appear to be distinct in shape and size.

46 **Conclusions:** Gemcitabine alters cell morphology but did not induce cell death phenotype after
47 24 hours. Exosomes markers change in response to gemcitabine. The released exosomes showed
48 changes after drug exposure, implying a possible response to gemcitabine. Exosomes content and
49 cellular effect remains to be explored.

50

51 Introduction

52 Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) originates in the ductal pancreatic epithelium
53 and represents about 90% of the pancreatic cancer disease cases ¹. Although PDAC is not among
54 the most common cancer types, it is listed as the seventh cause of deaths related to cancer
55 worldwide ². As PDAC shows non-specific symptoms, most patients present the disease in a very
56 advanced stage at the moment of diagnosis, with high metastatic potential. Thus, early diagnosis
57 remains the major barrier for PDAC treatment ^{3,1}. Surgical resection is not possible in advanced
58 disease stages. So, for these patients chemotherapy is the main treatment option ⁴.

59 In pancreatic cancer, chemotherapy is based mainly on gemcitabine (GEM) ⁵. In the last
60 decade, some combined treatments displayed advances, but the current protocols still rely on cycles
61 of GEM ^{6,7,8}. GEM is a nucleotide analog, working molecularly through masked chain termination
62 mechanism ⁹. This means that the molecule works as a usual nucleotide and is incorporated at the

63 new DNA strands in the moment of cell replication. As GEM is incorporated at the new DNA
64 strand, it permits the addition of one more nucleotide and then the replication process ceases
65 through steric inhibition. DNA polymerase exonuclease 5'-3' activity is repressed by the nucleotide
66 added correctly after GEM. GEM also works via secondary mechanisms that interfere with
67 nucleotide processing and pool, grating its addition at the DNA replication¹⁰.

68 Exposure of tumor cells to low drug doses and non-lethal treatment periods cause change in
69 cell metabolism and molecular mechanisms, that could induce morphological and physiological
70 anomalies^{11,12,13}. Sublethal doses and not correct treatment periods can cause the emergence of
71 drug resistance phenomena and alter cell processes, changing signaling pathways in reponse to this
72 stimuli. In PDAC, sublethal doses of chemotherapeutic drugs are a concerning topic, as pancreas
73 physical architecture do not enable full penetrance and spreading of molecules, keeping different
74 organ areas exposed to disparate drug doses for variating times^{14, 15,16}. Pancreas is very dense in
75 cells and a low vascularized and enervated organ^{6,7}. Besides, very dense solid tumors also show
76 low vascularization and not attainable inside structures. So, chemotherapy delivered through
77 circulatory system, can not reach pancreatic tumors in an homogenous way, creating sub dosage
78 areas in the organ, triggering different molecular responses in the cells exposed. Resistance and
79 non-response to treatment is well documented in PDAC literature and could be a result of these and
80 other combined factors^{4,8,17}.

81 There are many examples of chemotherapeutic resistance for almost all types of cancers in
82 literature^{18,19,20,21}. Recent evidences suggest that cell communication has an important role in these
83 phenomena, notably the extracellular vesicles pathways^{22,23}. Extracellular vesicles are responsible for
84 a diversity of cell to cell signalling purposes, that appears to be altered not only in cancer but in
85 other pathologies²⁴. These double layer lipidic vesicles are classified by its origin and size.
86 Exosomes (EXOs), the vesicles ranging from 40 – 100 nm and formed from multivesicular bodies,
87 have been associated with many tumorigenic process^{17,25,26}. EXOs have high penetrance capability,
88 trespassing even the blood-brain barrier, and the wide range of molecules they are able to transport
89 due to its origin are described as capable of cell and extracellular matrix altering through DNAs,
90 RNAs and protein delivery^{27,28}.

91 For PDAC, the interplay between cell to cell communication through extracellular vesicles
92 and chemotherapeutic response have been recently explored. Some research demonstrated the
93 presence of miRNAs associated with chemoresistance in the vesicles secreted by chemotherapy
94 treated cells^{29,30}. As exosomes are related not only to chemoresistance but also with hyperplasia
95 initiation, evolution and outcomes^{20,23,31}, further research is needed to clarify their role in PDAC
96 tumor development. Few works focus on PDAC cells response to GEM treatment at EXOs level,
97 after a non-lethal chemotherapeutic regime applied, which could be the first step at

98 chemoresistance establishment in pancreatic cancer. Investigating exosome secretion after GEM
99 treatment in PDAC cells could provide useful information not only about drug resistance but also
100 to improve early diagnosis, two major barriers in pancreatic cancer handling.

101

102 Methods

103

104 Cell culture - The PANC-1 cell line (Banco de Células do Rio de Janeiro - BR) was cultured at
105 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose media (Thermo Fisher Scientific - US)
106 with 10% fetal bovine serum (FBS) supplementation and penicillin and streptomycin (PS) 1%
107 (Thermo Fisher Scientific). The cultures were subcultured every time they reach 80% confluence.

108

109 Gemcitabine treatment – PANC-1 cells were plated at 5.5×10^4 cells/mL at 24-well plates (Greiner
110 Bio-one International - AT) and maintained in DMEM media FBS 10%, PS 1% for 24 h. Then,
111 cells were washed with PBS 1X and DMEM media containing different GEM doses (1, 10 and 30
112 μ M) or vehicle (water) was added to the cells. After 24 h, cells were collected and tested for
113 necrosis, autophagy and apoptosis. The treatment doses and times used in this work were based on
114 studies performed by Awasthi *et al.*, 2013³² and Yong-Xian *et al.*, 2013³³.

115

116 Apoptosis assay – Apoptosis and necrosis were evaluated using Annexin V apoptosis kit (Santa
117 Cruz Biotechnology - US) as manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry (Attune
118 Cell Cytometer - Applied Biosciences - US).

119

120 Autophagy – Autophagy was evaluated by flow cytometry using acridine orange (1 μ g/mL) added
121 as a stain after cells collection and incubation for 15 min. Autophagy was also monitored by
122 western blot using LC3-II antibody (Abcam - UK).

123

124 Conditioned Media - To vesicles isolation, cells (5.5×10^4 cells/mL) were plated at T75 culture
125 flasks. After 24 h, the media were substituted by DMEM FBS 10% with 10 μ M gemcitabine
126 (Sigma-Aldrich - US) or vehicle. After 24 h, cells were washed with PBS 1X and cultured with
127 DMEM, without FBS supplementation, for additional 24 h. Then culture supernatant was collected,
128 labeled as conditioned media (CM) and submitted to vesicle isolation or stored at 4 °C for 1
129 week maximum.

130

131 Exosome Isolation – The exosomes released by GEM treated and untreated cells were isolated from
132 CM by sequential centrifugation and ultracentrifugation as described by Colombo *et al.*, 2014²⁷,
133 with some modifications. Briefly, CM was submitted to sequentially centrifugation at 1 200 x g 10
134 min, 3 000 x g 20 min and 10 000 x g 30 min to remove cell debris, cells, and large vesicles,
135 respectively. The resultant supernatants were filtered at 0.22 µm filter unit (Termo Fisher
136 Scientific), eliminating vesicles larger than 220 nm. These CMs were subjected to
137 ultracentrifugation (Beckman Coulter - US) for 2 h at 100 000 x g, 4 °C to exosome sedimentation.
138 The recovered pellet was washed with PBS 1X and submitted to a new round of 2 h
139 ultracentrifugation at 100 000 x g, 4 °C. After, the pellet was resuspended in PBS 1X and stored at
140 -20 °C to the following experiments. Protein concentration assessed by Bio-Rad protein assay (Bio-
141 Rad – US), using Bradford method as manufacturer instructions, was used as an indirect tool to
142 measure vesicles concentration. The total protein obtained from each extraction was divided by the
143 input CM at the beginning of isolation process and yield was expressed as the mean of all
144 extractions performed (n=2).

145

146 Western Blot analysis – The cells treated with GEM as described before (1, 10 and 30 µM GEM),
147 were lysed using cell lysis buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, SDS 0,1% (v/v),
148 Triton X100 1% (v/v), Sodium Deoxycholate 1% (m/v), Proteases inhibitor mix 1% (v/v) and
149 phenylmethylsulfonyl fluoride 1% (v/v) – Sigma – Aldrich). Protein concentration was assessed
150 using Bradford method by Bio-Rad protein assay. Twenty micrograms of protein from each cellular
151 extract were resolved at a 12% SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene fluoride
152 (PVDF) membranes. Membranes were blocked overnight at 4 °C, and incubated overnight with
153 primary antibodies (1:1 000 v/v in TBS 1X) at 4 °C. Secondary antibody incubation was conducted
154 for 2 h at 4 °C and revelation was made using ECL Immobilon Western Chemiluminescent HRP
155 Substrate (Merck – Millipore – DE) at Imagequant LAS500 equipment (GE healthcare – US)
156 using PVDF membranes stained with Comassie G-250 (Sigma-Aldrich) as protein load control.
157 Primary and secondary antibodies were provided from CST - Exosomal Marker Antibody Sampler
158 Kit (Cell signaling – US) for exosomes markers CD54 and CD9 and anti-LC3B rabbit (Abcam –
159 UK) and anti-rabbit IGg, HRP linked (Cell signaling) for autophagy evaluation.

160

161 Transmission Electron Microscopy (TEM) – Fifteen microliters from isolated vesicles were set
162 over a carbon/copper grid, fixated with paraformaldehyde 2% (Sigma – Aldrich - US), contrasted
163 with uranyl acetate 1% (Sigma – Aldrich - US) and stored over silica beads for at least 1 day before
164 analysis. Micrographs were generated at MET JEM 1 200 Exll equipment at Centro de Microscopia
165 e Microanálise (CMM – UFRGS).

166 Dynamic Light Scattering (DLS) Analysis – Mean size of vesicles in samples was determined by
167 DLS method in zeta sizer equipment (Zeta Sizer nano – Malvern - UK) at Faculdade de Farmácia
168 (UFRGS). Analysis were performed by dilluting vesicle samples 1/1 000 (v/v) in MilliQ water.

169

170 Results

171

172 GEM effects on PANC-1 cells

173 We treated PANC1 cells with different doses of GEM in order to evaluate drug effects on
174 morphology, death and autophagic metabolism. We chose a short incubation time seeking a
175 treatment that did not interfere in the vesicles release, as it is known that highly apoptotic and
176 necrotic cells have little secretory phenotypes and the autophagic metabolism impairs vesicles
177 formation.

178 As denoted in Fig. 1a to d, microscopic analysis revealed that after 24 h treatment with 1,
179 10 and 30 μM GEM, PANC-1 cells presented significant morphological changes. Compared to
180 vehicle treated cells, GEM treated cells became misshapen and showed a detached morphology,
181 evidencing that GEM has a clear effect over PANC-1 cell line morphology, at all tested conditions.
182 To confirm the observed morphological changes, flow cytometry analyses were performed as
183 illustrated by Fig. 1 e. Changes in FSC parameter were detected after GEM treatment for all tested
184 drug concentrations, indicanting cell size alteration. Vehicle treated cells are about half of the size
185 of GEM treated cells and no statistical difference in cell size between GEM tested doses was
186 observed.

187 Cell death analysis for PANC-1 cells treated over 24 h with 1, 10 and 30 μM GEM
188 indicates that necrosis and apoptosis were not induced in these conditions (Fig. 1 f). GEM treated
189 cells showed no statistical difference compared to vehicle treated cells for necrosis and apoptosis,
190 suggesting that our doses and drug incubation time were not sufficient to induce cell death.

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

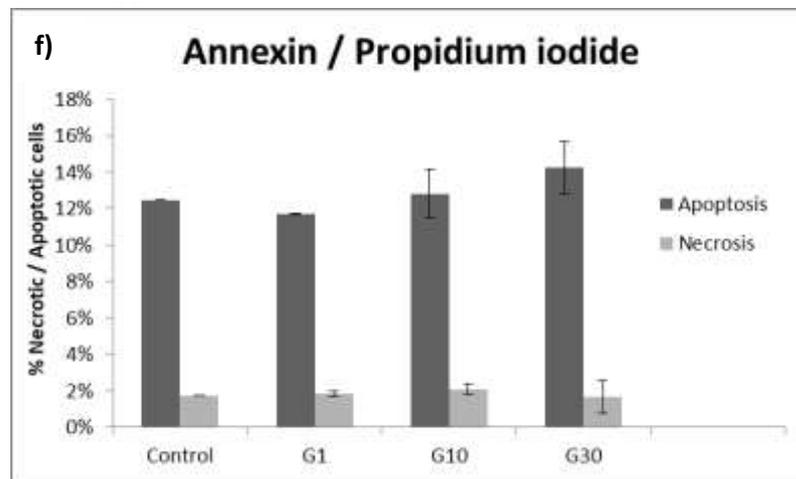
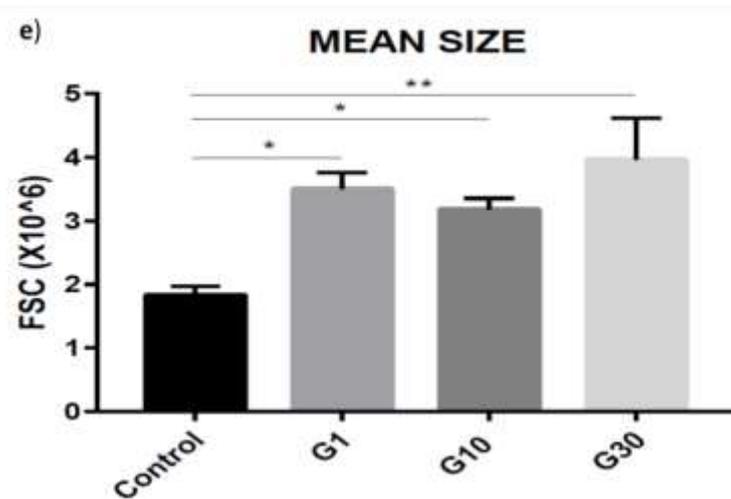
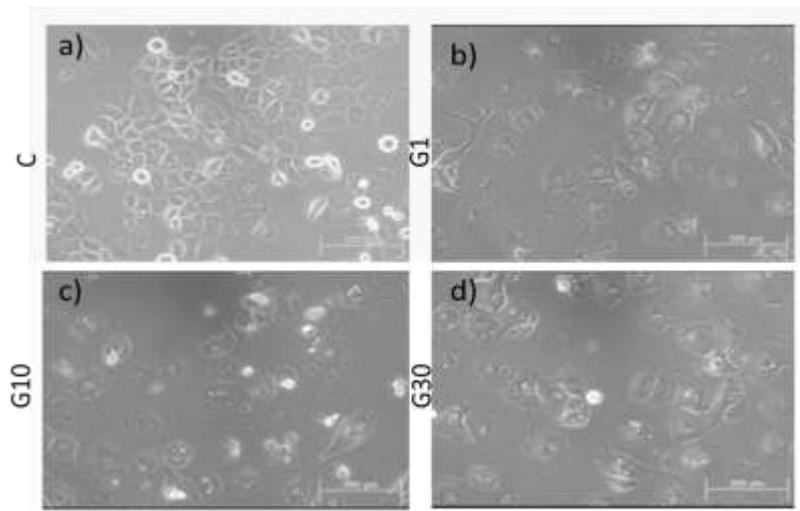
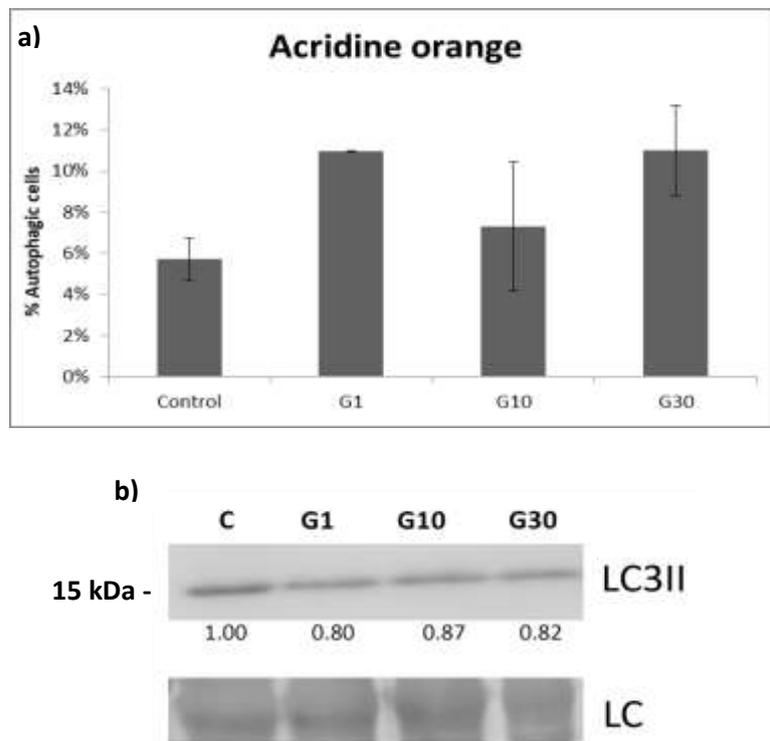


Figure 1: GEM effects on PANC-1 cells. Microscopy images obtained from cells after 24 h of treatment with a) vehicle or gemcitabine at b) 1 μ M (G1), c) 10 μ M (G10) and d) 30 μ M (G30). Scale bars represents 200 μ m. e) Graphic quantification of FSC flow cytometry parameter (size) from PANC-1 cells. Anova test was performed at GraphPad prism 8 software, with Dunnet multiple comparisons test as non-parametric analysis. * indicates $p < 0,05$, and ** indicates $p < 0,01$. Bars represent standard deviation. f) Apoptosis and necrosis measured by flow cytometry via annexin and propidium iodide fluorescence, respectively. No statistical difference was obtained at Anova test, for any treatment. Bars represent standard deviation. At all results data from 2 (n=2) independent experiments.

236 GEM do not alter autophagy

237 GEM effects on cellular autophagy were evaluated for PANC-1 treated with 1, 10 and 30
238 μM of drug for 24 h. Flow cytometry analyses using acridine orange (Fig. 2 a) indicated that there
239 were no significant levels of autophagy in cells treated with GEM compared to vehicle treated
240 cells. To further investigate autophagy phenomena, Western blot analysis of LC3II protein, related to
241 autophagic flux, was performed (Fig. 2 b). There was little difference in the abundance of LC3II
242 protein between vehicle and GEM treated cells in 24 h. Besides that, no difference between GEM
243 concentrations could be detected. These results indicated low autophagic flux in PANC-1 cells, and
244 little or no significant change in this status after GEM treatment.

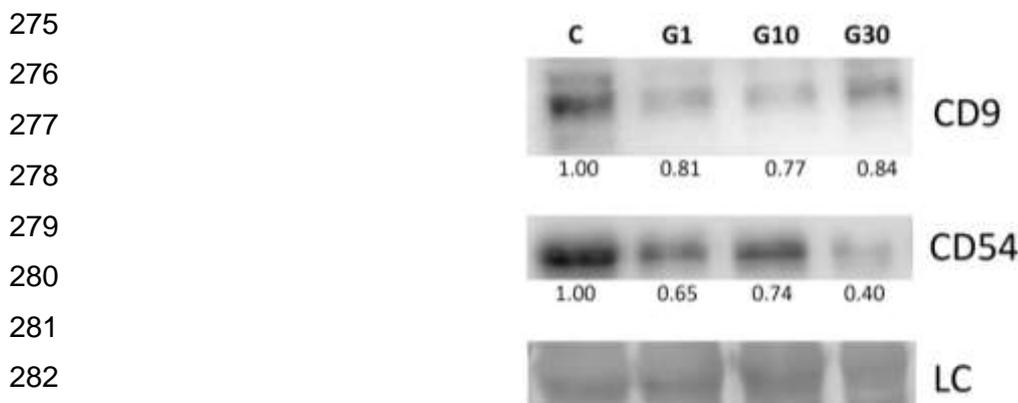


254
255
256
257
258
259
260 **Figure 2: GEM treatment does not alter autophagy status.** a) Autophagy measured via acridine
261 orange fluorescence turnover ratio. Graphic representation of flow cytometry experiments after 24 h drug
262 treatment. C = control, vehicle treated cells; GEM treated cells at G1 = 1 μM , G10 = 10 μM and G30 =
263 30 μM . Anova test performed at Graphpad prism 8 software showed no statistic difference between the
264 groups. Bars represent standard deviation. Data from 2 independent experiments (n=2). b) Western blot
265 analysis of autophagy-related protein LC3-II, after 24 h GEM treatment. Numbers underlaying results are
266 ImageJ software pixels quantification. LC = load control (protein), C = vehicle treated cells or, GEM
267 treated cells at G1 = 1 μM , G10 = 10 μM and G30 = 30 μM .

267 Altered expression of EXO markers in GEM treated cells

268 We evaluated changes in EXO markers CD9 and CD54 in different concentrations of GEM
269 PANC-1 treated cells, for 24 h, at cellular expression levels. We could observe a decrease in CD9
270 and CD54 protein abundance as a response to GEM treatment by Western Blot (Fig. 3). The GEM

271 dose of 10 μ M showed the same level of reduction in the expression of both markers, while 1 and
 272 30 μ M doses displayed more variable results, compared to vehicle treated cells. Therefore, by this
 273 and previous results, 10 μ M dose of GEM by 24h, was chosen as the treatment regime for the
 274 subsequent experiments of exosome isolation.



283 **Figure 3: GEM induces changes in cellular abundance of EXO markers.** Western Blot analysis of
 284 cellular extracts after 24 h GEM treatments. Numbers underlying results are ImageJ software pixels
 285 quantification. LC = load control (protein). C = control, vehicle treated. GEM at G1 = 1 μ M, G10 = 10
 286 μ M and G30 = 30 μ M.

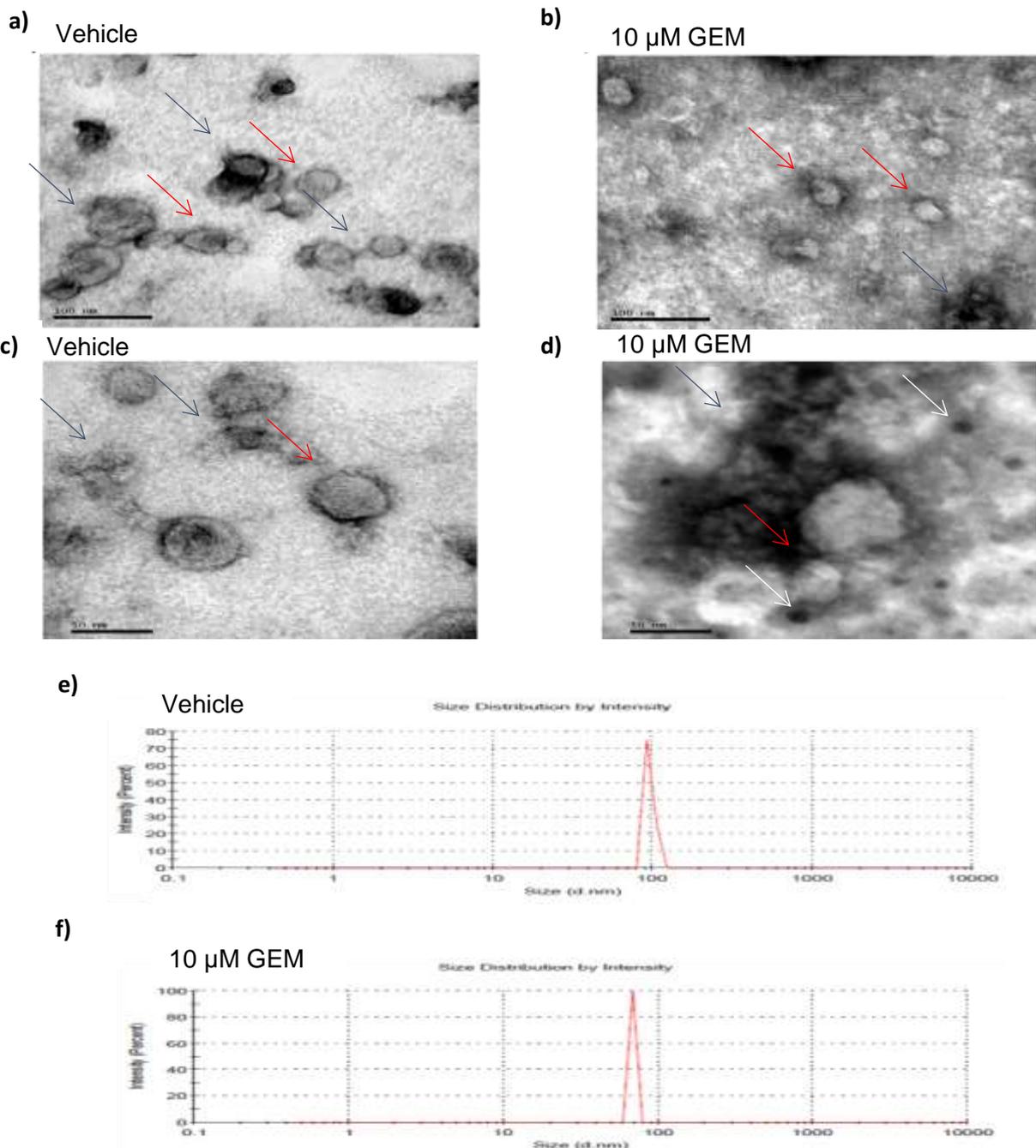
287 Exosome Isolation and Characterization

288 After treating PANC-1 cells with 10 μ M of GEM or vehicle for 24 h, the both resulting 24
 289 h of culture conditioned media was collected, filtered and extracellular vesicles isolated through
 290 ultracentrifugation. The vesicle yield was assessed by indirect quantification using Bradford assay.
 291 Vesicles isolated from vehicle treated cells yielded 0,16 μ g/mL of protein while vesicles isolated
 292 from 10 μ M GEM treated cells yielded 0,225 μ g/mL of protein. Although no statistical difference
 293 was observed by t student test between GEM treated or vehicle treated cells, vesicle protein
 294 recovery was 40% higher for cells exposed to the drug (Table 1).

295 **Table 1: Size and concentration of vesicles released by PANC1 cells treated with vehicle or GEM.** Raw data
 296 obtained from DLS experiments (expressed by mean +/- standard deviation) and indirect vesicle quatification
 297 trough protein concetration measurement by Bradford assay (mean total protein obtained after vesicle isolation,
 298 corrected by CM volume produced). (n=2).

	Average size (nm)	Protein recovery (μ g/mL of cultured media)
Vehicle vesicles	94,87 +/- 6,235	0,16
10 μ M GEM vesicles	68,06 +/- 0	0,23

305 TEM analyses revealed that vesicles obtained from vehicle and 10 μ M GEM treated cells
 306 have sizes compatible with EXO scale (40 – 100 nm) (Fig.4 a to d). Comparing exosomes obtained
 307 from control (Fig. 4 a and c) and GEM treated cells (Fig. 4 b and d), we could notice some
 308 particular differences. EXOs obtained from PANC-1 cells treated with 10 μ M GEM look smaller
 309 and very spherical shaped. Also, they are more abundant at all fields analysed. On the other hand,
 310 EXOs obtained from vehicle treated cells look bigger in size, a good portion of it showed more
 311 non-spherical shapes and tend to be more aggregated in all microscopic fields analysed.



339 **Figure 4: GEM treatment alters EXO structure and size.** Electromicrography of vesicles obtained from PANC1 cells treated with vehicle (a and c) or 10 μ M of GEM (b and d) for 24 h. a) and b) magnification 300,000x. Scale bar represents 100 nm. c) and d) magnification 500,000x. Scale bars represents 50 nm. Red arrows indicate EXO structures, blue arrows indicate aggregation areas and white arrows show very small structures at the equipment limit of detection, found only in GEM treated fields. Figures are representatives of 2 independent TEM preparations. DLS graphic reports for EXO isolated from e) vehicle and f) GEM treated cells indicating mean size change.

340 DLS experiments (Fig 4 e and f; Table 1) demonstrated that GEM affects EXO size.
341 Vehicle treated cells isolated EXOs presented a mean diameter of 94.87 nm, whereas EXOs from 10
342 μM GEM treated cells showed a mean diameter of 68,06 nm. Overall, our results indicated that
343 GEM treatment affect EXO release, size and structure, impacting cell communication processes as
344 a result of non-lethal GEM exposure.

345

346 Discussion

347

348 As PDAC shows a high mortality rate worldwide its necessary to further investigate the
349 cell biology and molecular mechanisms to understand particulars in its behavior and also to dispose
350 of strategies for early diagnosis and advanced disease treatments ^{4,7}. The very advanced stage in
351 what patients seek treatment is responsible for high mortality rates and could explain the reasons
352 for so many chemoresistant cases documented ^{20,21,29,34}. A new approach in cell communication
353 could elucidate the aggressive phenotype of PDAC and the strong resistance of that tumor cells
354 demonstrate to GEM treatment.

355 GEM is the main chemotherapeutic alternative for PDAC treatment, but there is a lack of
356 information on cellular effects and response to this drug, specially in terms of cell communication.
357 Also the supporting literature is often confused and low established. As dennoted in the present
358 work, 24 h treatment with different doses of GEM is not sufficient to induce cell death in PANC-1
359 cells, but it is able to cause morphological alteration in the treated cells. The literature also
360 corroborates with these data, as cited by Awasthi *et al.* (2013)³², Yong-Xian *et al.* (2016)³³ and Zhu
361 *et al.* (2018)³⁵. The killing effect observed in these works was reached only after longer periods
362 treatments (48 – 72h), or higher GEM concentrations (100 μM). This chareteristic behavior could
363 be described by the fact that GEM needs more than just a few cell cicles to produce significant
364 effects, what could be explained by its mechanism of action. GEM takes time to decrease common
365 dNTPs and make GEM itself a great part of nucleotide pool by its accessory mechanisms,
366 interfering with cell replication ^{9,10}. However, to our main purpose, that was to elucidate effects of
367 the drug over cell to cell communication processes mediated by EXOs, this might be a beneficial
368 phenomenon. If GEM had an fast killing effect, cells would prepare to cell death and probably no
369 extracellular vesicles could be realesed. In addition, our supernatant samples would be
370 contaminated by cell debries and fragments, which would turn the EXO purification process more
371 difficult. Moreover, if cells respond to GEM by entering in an autophagic metabolism, vesicles
372 would not be produced, as membranes would be reallocated to autophagy ^{36,37}. Cell reaction to
373 GEM exposure drug metabolism until the effective cell death, remains unknown. We suggest that
374 PANC-1 cells could react to GEM exposure by entering in a very secretory phenotype, that could

375 contribute to further chemoresistance and its vesicles could be delivering molecules that could
376 improve its ability to keep GEM low cytotoxic³².

377 During GEM treatment we observed changes in cellular abundance of EXO markers in
378 PANC-1 cells^{38,39}. We expected that EXO markers decrease its concentration in cellular extracts
379 upon GEM exposure, since the drug could be inducing a secretory phenotype and EXOs would
380 need to be produced and released from the cell. In fact, we observed this behavior for all GEM
381 tested doses, however there were differences in CD9 and CD54 expression depending on drug
382 concentration. As both markers showed the same amount of decrease in 10 μ M treatment, and a
383 pronounced decrease in CD54 for 1 and 30 μ M treatments, molecular responses to GEM not
384 involved with EXO production and release pathways for these last two treatments could interfere in
385 the further analyses. CD54 is an adhesion involved molecule³⁸, so responses to GEM could be
386 altering cell adhesion and interfere with secretory pathways. Also, such low production of CD54
387 could indicate no EXO producing behavior.

388 Overall all these observations supported by dose-response studies on literature^{32,33,35},
389 showed that 10 μ M GEM treatment for 24 h is the best choice to investigate drug effect on EXO
390 production. Summarizing, no dose presented cell death related phenotype in our study, all
391 concentrations induced morphology change in response to GEM, no autophagic metabolism could
392 be detected and EXO markers vary equally at 10 μ M treatment. And also the literature describes
393 this concentration as IC₅₀ at longer treatment periods.

394 Applying the established treatment of 10 μ M GEM for 24 h, we have isolated and
395 characterized the extracellular vesicles released by PANC1 cells. Our vesicle characterization
396 revealed some interesting aspects of EXO released in response to GEM. First, the sizes obtained in
397 all analysis are around 100 nm, corresponding to exosomes size range, confirmed by TEM and
398 DLS techniques. Also, the shape of vesicles revealed by TEM and the characteristic spherical
399 morphology (Fig. 2) are corresponding to exosomes portrayal by the literature^{17,27}. Exosomes were
400 previously described as carriers of molecules responsible for worst prognosis and metastatic
401 formation in pancreatic cancer^{21,34,40,41}. So, it is not surprising that cell response to GEM could be
402 affecting extracellular communication pathways. As revealed by TEM and DLS, GEM affects
403 exosomes shape and size, reducing the vesicles size and making them less aggregated as compared
404 to EXO isolated from vehicle treated cells. PANC-1 cells appears to be more secretory in response
405 to the drug, result also supported by the indirect EXO quantification through protein concentration
406 measurement that showed an increase after GEM treatment. In addition, these cells are already
407 described as high secretory¹⁷. However, the cargo of these exosomes remains unknown, and needs
408 to be explored.

409 The characterization of cellular response to chemotherapeutic treatment is crucial for
410 understanding cell behavior and could help to elucidate better ways to treat patients and improve
411 life quality and expectancy in the field of cancer research. Especially in the context of pancreatic
412 cancer, more studies are necessary to reveal cells response to GEM, as they could expand the
413 knowledge about this disease and reveal mechanisms that could be used as tools to overcome
414 treatment barriers in PDAC. Our study unveils a cellular response newly reported to PANC-1 cell
415 line, and for our knowledge, to pancreatic cancer in general, which comprise changes in EXO
416 biology as response to GEM treatment. As EXO physically changes in response to GEM, we
417 expect to analyse the cargo content of these vesicles, to understand which metabolic signals follow
418 these changes. We hope this could lead to better understanding of pancreatic cancer processes and
419 could help to elucidate what are the first cellular responses to drug contact that could lead to
420 chemoresistant phenotype.

421

422 Acknowledgements

423

424 We would like to thanks Dr. Patricia Prolla for donating the cell line, Ronize Zeni for
425 providing some previous data and UFRGS and HCPA for promoting physical space, structure and
426 resources for realizing this work.

427

428 Funding

429

430 This work was supported by brazillian science promotion agencies CAPES, CNPQ and
431 FIFE-HCPA.

432

433 Authors Contributions

434

435 Da Rosa, S. A had full access to all of the data and take responsibility for the integrity of
436 the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: all authos. Acquisition,
437 analysis or interpretation of data: all authors. Drafting of manuscript: da Rosa, S. A. Critical
438 revision of the manuscript for important intellectual content: all authors. Statistical analysis: da
439 Rosa, S. A. Obtained funding: Lopez, PLC and Monteiro, KM.. Study supervision: Lopez, PLC and
440 Monteiro, KM.

441

442 Availability of data and material

443

444 For further information, data access and material availability, please contact authors.

445

446

447 Conflicts of Interest

448

449 The authors declare no conflict of interest

450

451

452 References

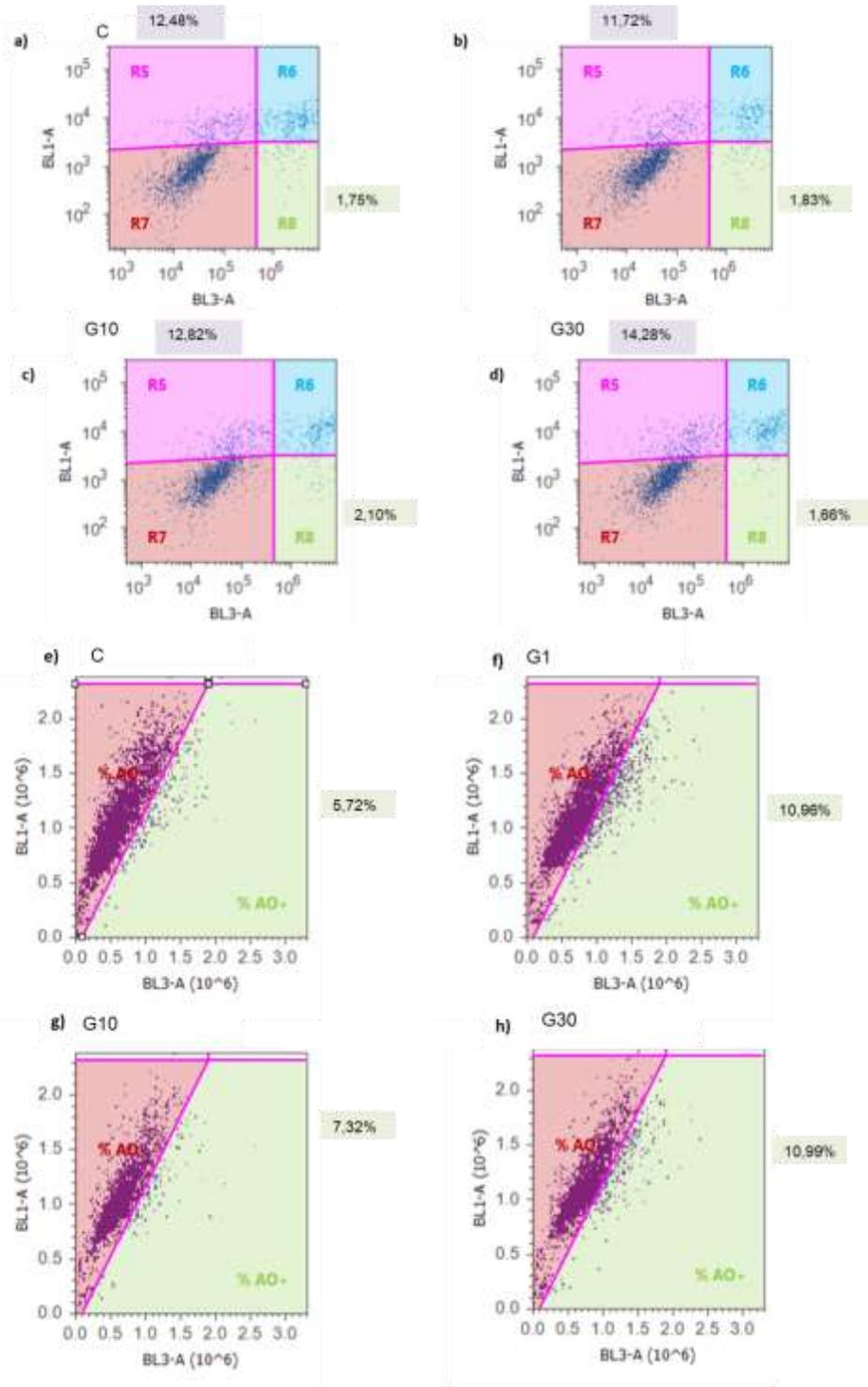
453

- 454 1. Kanji ZS, Gallinger S. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *CMAJ*.
455 2013;185(14):1219-26.
- 456 2. World Health Organization - who. International Agency For Research in Cancer. Global
457 Cancer Observatory 2018. Available at: < <http://gco.iarc.fr/>>. Access: 26 jan. 2019.
- 458 3. Johns Hopkins Medicine. The Sol Goldman Pancreatic Cancer Research Center. Available
459 at: < <http://pathology.jhu.edu/> >. Access: 26 jan 2019.
- 460 4. Moutinho-Ribeiro P, Coelho R, Giovannini M, Macedo G. Pancreatic cancer screening:
461 Still a delusion? *Pancreatology*. 2017;17(5):754-65.
- 462 5. Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis
463 of clinical trials. *Br J Cancer*. 2007;96(6):896-902.
- 464 6. Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, DeWitt J, Easler JJ, Agarwal DM, et al. A
465 Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review. *Am J Gastroenterol*.
466 2017;112(4):537-54.
- 467 7. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic
468 cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J*
469 *Gastroenterol*. 2018;24(43):4846-61.
- 470 8. Yabar CS, Winter JM. Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterol Clin North Am*.
471 2016;45(3):429-45.
- 472 9. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms
473 of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*.
474 2014;741:8-16.
- 475 10. Gesto DS, Cerqueira NM, Fernandes PA, Ramos MJ. Gemcitabine: a critical nucleoside for
476 cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2012;19(7):1076-87.
- 477 11. Li Q, Ma Z, Liu Y, Kan X, Wang C, Su B, et al. Low doses of paclitaxel enhance liver
478 metastasis of breast cancer cells in the mouse model. *FEBS J*. 2016;283(15):2836-52.
- 489

- 490 12. Hohmann N, Haefeli WE, Mikus G. CYP3A activity: towards dose adaptation to the
491 individual. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(5):479-97.
492
- 493 13. Wurz GT, DeGregorio MW. Activating adaptive cellular mechanisms of resistance
494 following sublethal cytotoxic chemotherapy: implications for diagnostic microdosing. *Int J*
495 *Cancer*. 2015;136(7):1485-93.
496
- 497 14. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers*
498 *(Basel)*. 2017;9(11).
499
- 500 15. Fryer RA, Barlett B, Galustian C, Dalglish AG. Mechanisms underlying gemcitabine
501 resistance in pancreatic cancer and sensitisation by the iMiD™ lenalidomide. *Anticancer*
502 *Res*. 2011;31(11):3747-56.
503
- 504 16. Yeo TK, Kintner J, Armand R, Perez R, Lewis LD. Sublethal concentrations of
505 gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) alter mitochondrial ultrastructure and function
506 without reducing mitochondrial DNA content in BxPC-3 human pancreatic carcinoma
507 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2007;26(12):911-21.
508
- 509 17. Zhao C, Gao F, Weng S, Liu Q. Pancreatic cancer and associated exosomes. *Cancer*
510 *Biomark*. 2017;20(4):357-67.
511
- 512 18. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug
513 resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):623-42.
514
- 515 19. Vlaeminck-Guillem V. Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis,
516 Diagnosis, and Management. *Front Oncol*. 2018;8:222.
517
- 518 20. Zheng H, Zhan Y, Liu S, Lu J, Luo J, Feng J, et al. The roles of tumor-derived exosomes in
519 non-small cell lung cancer and their clinical implications. *J Exp Clin Cancer Res*.
520 2018;37(1):226.
521
- 522 21. Zhou M, Chen J, Zhou L, Chen W, Ding G, Cao L. Pancreatic cancer derived exosomes
523 regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cell Immunol*. 2014;292(1-
524 2):65-9.
525
- 526 22. Cesselli D, Parisse P, Aleksova A, Veneziano C, Cervellin C, Zanella A, et al.
527 Extracellular Vesicles: How Drug and Pathology Interfere With Their Biogenesis and
528 Function. *Front Physiol*. 2018;9:1394.
529
- 530 23. Wang M, Zhou L, Yu F, Zhang Y, Li P, Wang K. The functional roles of exosomal long
531 non-coding RNAs in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2019.
532
- 533 24. Sardar Sinha M, Ansell-Schultz A, Civitelli L, Hildesjö C, Larsson M, Lannfelt L, et al.
534 Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta
535 oligomers. *Acta Neuropathol*. 2018;136(1):41-56.

- 536
537 25. Sun CY, Zhu Y, Li XF, Wang XQ, Tang LP, Su ZQ, et al. Scutellarin Increases Cisplatin-
538 Induced Apoptosis and Autophagy to Overcome Cisplatin Resistance in Non-small Cell
539 Lung Cancer via ERK/p53 and c-met/AKT Signaling Pathways. *Front Pharmacol.*
540 2018;9:92.
541
542 26. Vall-Palomar M, Arévalo J, Ariceta G, Meseguer A. Establishment of urinary exosome-
543 like vesicles isolation protocol for FHHNC patients and evaluation of different exosomal
544 RNA extraction methods. *J Transl Med.* 2018;16(1):278.
545
546 27. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of
547 exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-89.
548
549 28. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, Kapogiannis D, Gorospe M. RNA in extracellular
550 vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(4).
551
552 29. Mikamori M, Yamada D, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, et al.
553 MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in
554 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2017;7:42339.
555
556 30. Qiu J, Yang G, Feng M, Zheng S, Cao Z, You L, et al. Extracellular vesicles as mediators
557 of the progression and chemoresistance of pancreatic cancer and their potential clinical
558 applications. *Mol Cancer.* 2018;17(1):2.
559
560 31. Ouyang M, Li Y, Ye S, Ma J, Lu L, Lv W, et al. MicroRNA profiling implies new markers
561 of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(5):e96228.
562
563 32. Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, et al. Comparative
564 benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in
565 experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2013;34(10):2361-9.
566
567 33. Yong-Xian G, Xiao-Huan L, Fan Z, Guo-Fang T. Gemcitabine inhibits proliferation and
568 induces apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *J Cancer Res Ther.*
569 2016;12(Supplement):1-4.
570
571 34. Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Takikawa T, Nabeshima T, Shimosegawa T.
572 Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce activation and profibrogenic
573 activities in pancreatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;495(1):71-7.
574
575 35. Zhu J, Chen Y, Ji Y, Yu Y, Jin Y, Zhang X, et al. Gemcitabine induces apoptosis and
576 autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Biotechnol*
577 *Appl Biochem.* 2018;65(5):665-7
578
579 36. Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health
580 and disease. *Biotechnol J.* 2017;12(1).
581

- 582 37. Pleet ML, Branscome H, DeMarino C, Pinto DO, Zadeh MA, Rodriguez M, et al.
583 Autophagy, EVs, and Infections: A Perfect Question for a Perfect Time. *Front Cell Infect*
584 *Microbiol.* 2018;8:362.
- 585
586 38. Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the
587 incentive push. *World J Gastroenterol.* 2016;22(26):5971-6007.
- 588
589 39. Lu J, Li J, Liu S, Wang T, Ianni A, Bober E, et al. Exosomal tetraspanins mediate cancer
590 metastasis by altering host microenvironment. *Oncotarget.* 2017;8(37):62803-15.
- 591
592 40. Charrier A, Chen R, Chen L, Kemper S, Hattori T, Takigawa M, et al. Connective tissue
593 growth factor (CCN2) and microRNA-21 are components of a positive feedback loop in
594 pancreatic stellate cells (PSC) during chronic pancreatitis and are exported in PSC-derived
595 exosomes. *J Cell Commun Signal.* 2014;8(2):147-56.
- 596
597 41. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic
598 cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.*
599 2015;17(6):816-26.



Supplementary Figure 1: Flow cytometry reports from Annexin V/Propidium iodide and Acridine Orange experiments. Annexin V/Propidium iodide results for a) vehicle treated cells (C), GEM treated cells at b) 1 μ M (G1), c) 10 μ M (G10) and d) 30 μ M (G30). All parameters were set based at annexin only and propidium iodine only controls. Acridine orange results for e) vehicle treated cells (C), GEM treated cells at f) 1 μ M (G1), g) 10 μ M (G10) and h) 30 μ M (G30). All parameters were set based at vehicle autophagy range control. Color boxes at side of figures indicates cells percentage (%) from total.

4. DISCUSSÃO

EXOs têm demonstrado grande importância no contexto tumoral, seja na regulação de células associadas ao tumor, no estabelecimento dos nichos tumorais, na metastização, estabelecimento de resistência tumoral e em muitos outros processos (Jin, Wu & Tan, 2016; Nuzhat *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2018; Yan, Fu & Ming, 2018). No entanto, na área de câncer de pâncreas, esse tipo de vesícula extracelular precisa ser melhor explorado. Muitos trabalhos demonstram seu potencial uso como ferramenta de diagnóstico precoce, o que representa um grande avanço para o tratamento da doença e potencial de cura aos pacientes (El Andaloussi, 2013; Fogel *et al.*, 2017; Batista & Melo, 2019). Outros estudos denotam sua participação em processos tumorais já estão estabelecidos, regulação e sinalização das demais células não tumorais e seu comportamento frente aos tratamentos quimioterápicos (Robinson *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2017; Batista & Melo, 2019; Massoumi *et al.*, 2019). Contudo, muitas lacunas no entendimento da biologia celular de PDAC levam ao não completo entendimento de sua evolução, resposta a GEM e quimiorresistência e consequentemente altos índices de letalidade e poucas estratégias de ação.

No presente trabalho avaliamos a resposta de células da uma linhagem de ADP, PANC-1, ao tratamento com o quimioterápico padrão utilizado no tratamento de tumores pancreáticos, GEM (Mcguigan *et al.*, 2018). Apesar do pequeno número de trabalhos na área, é possível observar um padrão de resposta desta linhagem celular à GEM. Como demonstrado em nossos estudos celulares, apesar de o quimioterápico afetar estrutura e morfologia celular, é necessário um tempo mais longo que 24 h de contato e efeito de tal droga, para a observação de respostas pronunciadas e alterações em desfechos celulares visto que não observamos alterações no metabolismo de morte via necrose e apoptose e fluxo autofágico após esse tempo de tratamento. Tal resposta se manteve coerente com a observada nos estudos de Awasthi *et al.*, (2013), Yong-Xian *et al.*, (2016) e Zhu *et al.*, (2018), uma vez que nesses trabalhos, doses similares necessitam de tempos maiores para atingir o efeito letal (48 – 72h) e se comportam de maneira similar no mesmo tempo analisado (24 h). Apesar de não haver indução de morte celular nas primeiras horas de tratamento, tanto para as doses testadas neste estudo, como para as doses utilizadas na

literatura, é possível ver que existem interferências profundas no metabolismo celular causadas por GEM (Song, Baba & Mukaida, 2016; Zhu *et al.*, 2018).

GEM é um análogo de nucleosídeo, o qual precisa ser incorporado ao DNA durante o processo de replicação para produzir efeitos no metabolismo celular. Através do seu mecanismo de ação *masked chain termination*, a droga é incorporada e impede que o ciclo celular siga seu fluxo normal, impedindo divisões corretas e aumento na população de células (De Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014). Entranto, na forma como é comercializada, gemcitabina hidrocloreto, a droga não possui efeito direto no metabolismo celular. A mesma precisa ser absorvida e transportada para o ambiente intracelular através de transportadores específicos e através da ação de diversas enzimas intracelulares passa à sua forma nucleotídica trifosfatada, onde pode ser incorporada à fita de DNA nascente. Além disso, os mecanismos acessórios pelos quais GEM age, também necessitam de tempo para ocorrer. Por exemplo, no seu primeiro contato com o ambiente intracelular, GEM depois de ser absorvida e modificada, se torna apenas mais um entre os demais nucleotídeos a serem incorporados na fita de DNA nascente, fazendo parte do pool de dNTPs que alimenta a replicação, sendo incorporada ao acaso. No entanto, sua ação sobre a enzima ribonucleotídeo redutase, responsável por produzir deoxinucleotídeos, inibindo-a por ligação covalente faz com que esse *pool* de dNTPs se torne cada vez menos diverso, aumentando a probabilidade de incorpoções ao acaso de GEM ao DNA nascente e impulsionando seu efeito (Gesto *et al.*, 2012).

Assim sendo, é esperado que tratamentos curtos, como o de 24 h, não possuam grandes efeitos sobre a quantidade total de células e os possíveis desfechos de morte celular. No entanto, longos tempos exposição a GEM, descritos na literatura como 72 h para doses próximas às utilizadas neste estudo, levam a efeitos acentuados e danos irreparáveis ao ciclo celular, causando efeitos pronunciados sobre o número total de células (Awasthi *et al.*, 2013; Yong-Xian *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018). O mesmo efeito pode ser observado em outras linhagens de tumores pancreáticos, como por exemplo em células Mia PaCa e Colo³⁵⁷ (Aspe *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2017). A baixa taxa de morte celular induzida por GEM em tempos curtos de tratamento em PANC-1 é o fato que permite o estudo de vesículas extracelulares em tal linhagem e inclusive poderia explicar a resistência adquirida observada no tratamento com GEM (Becker *et al.*, 2016; Tai *et al.*, 2018) bem como, o motivo pelo qual PANC-1 é uma linhagem descrita como naturalmente

mais resistente a GEM (Fryer *et al.*, 2011). Se nossa análise fosse realizada em um momento em que GEM induz altas taxas de apoptose ou necrose (72 h de acordo com a literatura), as amostras seriam contaminadas com debris, restos celulares e corpos apoptóticos, o que dificultaria a purificação de EXO, bem como apresentariam populações vesiculares escassas, uma vez que as células estariam se preparando para eventos de morte celular, com seu metabolismo e membranas alocados para esses processos e não para fins de comunicação celular. Apesar de não possuir efeitos letais pronunciados nas primeiras horas de tratamento, GEM causa alterações consideráveis, afetando a morfologia geral da célula, como observado em nossos dados, bem como modificando vias de sinalização e rotas metabólicas, como descrito na literatura (Yong-Xian *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2018). Esse período em que GEM é incorporada e modificada, bem como atua via seus mecanismos acessórios, é um período com alta atividade de comunicação célula-célula, como podemos ver pelo aumento do número de exossomos secretados observado através de TEM e da quantificação proteica relativa. Não sabemos se esse aumento de atividade secretória poderia ser uma resposta celular à GEM em uma possível ação da mesma sobre a via de transporte endossomal, ou se seria uma resposta celular de defesa, com sinalização de suporte ou atenção às demais células tumorais preparando-as ou alertando-as sobre um possível contato com GEM, no entanto, tal fato precisa ser melhor explorado.

O fenômeno de autofagia também apresentou uma baixa resposta nas doses de GEM testadas. Sabe-se que muitos tipos celulares possuem uma resposta autofágica como forma de defesa à quimioterapia (Li *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018). A autofagia, assim como a sinalização por vesículas extracelulares, é um processo que ocorre através da via endossomal e utiliza muito das membranas celulares. Recentemente, observou-se que altas taxas autofágicas rompem as vias de sinalização extracelular através de vesículas, uma vez que as membranas celulares estão sendo direcionadas ao processo de engolfamento de organelas e se tornam indisponíveis para a formação de corpos multivesiculares, necessários à produção de exossomos, por exemplo. Portanto, metabolismos altamente autofágicos não são característicos de células altamente secretórias. Além disso, o fenômeno recentemente descoberto e nomeado autofagia secretória compartilha vias e membranas com a via endossomal, podendo afetar a disponibilidade de bicamadas para a formação de vesículas extracelulares, quando exacerbado (Papandreou & Tavernarakis,

2017; Pleet *et al.*, 2018). Portanto, é esperado que durante as primeiras horas de contato com GEM, a autofagia esteja ocorrendo em baixos níveis, uma vez que observamos uma grande quantidade de liberação de vesículas. No entanto, GEM atua sobre as vias autofágicas, como demonstrado por Zhu *et al.*, (2018) e pelo leve decréscimo da proteína LC3-II observado em nossos resultados.

Muitos marcadores exossomais têm sido estabelecidos nos últimos anos. Por ser o tipo de vesícula extracelular cuja origem passa pela formação de endossomos, corpos multivesiculares, tráfico intracelular, carregamento de moléculas e posterior liberação, várias proteínas fazem parte de sua estrutura e superfície, participando de interações com o citoesqueleto e cascatas de sinalização de transporte. Em especial, várias tetraspaninas parecem ser muito importantes para a estruturação e formação dos exossomos, sendo as proteínas mais abundantes encontradas nessas vesículas (Heiler, Wang & Zöller, 2016; Lu *et al.*, 2017). Nossa investigação de marcadores exossomais nos lisados de células PANC-1 tratadas com GEM revelou diferentes padrões dose-dependentes. A tetraspanina CD9 e a molécula de adesão CD54, ambas descritas como componentes da membrana exossomal, apresentaram padrões de expressão distintos. Na dose de 10 μM os marcadores parecem reduzir igualmente os seus níveis de expressão em resposta a droga, podendo indicar liberação de exossomos. Nas demais doses testadas, 1 μM e 30 μM , foi observada uma maior diferença entre a expressão dos marcadores, e uma maior diminuição de CD54. Tais resultados poderiam indicar um menor efeito da droga na liberação de vesículas em células tratadas com 1 μM de GEM e um efeito maior em células tratadas com 30 μM da droga. No entanto, como tal efeito não é acompanhado por igual alteração na expressão de ambos os marcadores, influências de vias externas à de liberação exossomal poderiam afetar experimentos posteriores, bem como, o baixo nível de expressão de CD54 não acompanhado por CD9, poderia indicar inibição da via de liberação de exossomos.

Com base na análise de todos esses fenômenos, a dose de 10 μM foi escolhida para os experimentos posteriores uma vez que: tal dose é relatada como o IC_{50} para GEM em vários trabalhos (Awasthi *et al.*, 2013; Yong-Xian *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018); durante o tratamento das células PANC-1 por 24 h, demonstrou possuir efeitos celulares que levam à alteração da morfologia e estrutura das mesmas, sem induzir altas taxas de morte via necrose e apoptose que acarretariam em uma diminuição da produção de EXO para análises posteriores; não possui influência sobre o metabolismo autofágico, que poderia

levar à inibição de processos de comunicação celular vias vesículas e é, dentre as doses testadas, a única que demonstrou igual diminuição da expressão dos marcadores CD54 e CD9, o que pode indicar produção e liberação de EXO e baixa ou nenhuma influência de vias externas no metabolismo de EXO.

O potencial de exossomos pancreáticos em auxiliar fenótipos tumorais e estabelecer metástases está muito bem descrito e fundamentado na literatura (Charrier *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015; Masamune *et al.*, 2018). Em todos os trabalhos, é muito importante a etapa de caracterização vesicular, uma vez que, ainda não está bem estabelecido quais técnicas são primordiais para a identificação de um tipo de vesícula e não de outra (Mcguigan *et al.*, 2018).

Para o isolamento de EXOs, duas principais metodologias são empregadas: ultracentrifugação e precipitação (Colombo, Raposo & Théry, 2014; Li *et al.*, 2017). A ultracentrifugação compreende o uso de rotores que permitem submeter as amostras à acelerações muito superiores do que a força da gravidade. Tais acelerações permitem retirar suspensões muito pequenas, como os EXO das soluções que as contém. Variações da técnica envolvem a utilização de gradientes de viscosidade para isolamento de frações específicas, uso de filtros com diferentes porosidades para eliminação de faixas de vesículas e aplicação de centrifugações sequenciais para retirada de frações de não interesse. Tais técnicas são utilizadas principalmente para grandes volumes amostrais, no entanto, possuem normalmente um baixo rendimento devido à perdas, acoplamento de processos e baixa capacidade de precipitar as suspensões através das altas acelerações. As técnicas baseadas em precipitação envolvem o uso de agentes que permitem a retirada de partículas da solução usando características químicas de solventes e interações amostrais. Muitos kits comerciais se baseiam no uso dessas técnicas e compreendem diferentes combinações de solventes e soluções para tal. Variações compreendem o uso de anticorpos e imunoprecipitação para a retirada específica a partir de alvos definidos pelos anticorpos. Tais técnicas possuem um alto rendimento, no entanto, são menos específicas, uma vez que as soluções empregadas muitas vezes permitem a coprecipitação de faixas vesiculares de não interesse.

Poucos trabalhos exploram os dados obtidos na caracterização de EXOs, podendo perder dados importantes e de grande valor científico no processo. Em nosso estudo foi possível aplicar duas técnicas para a caracterização dos EXOs isolados após o tratamento

de células da linhagem PANC-1 com GEM 10 μ M, por 24 h. A primeira técnica utilizada e que revelou muitos detalhes sobre os efeitos da droga foi a microscopia eletrônica de transmissão. Primeiramente, em todas as imagens adquiridas, as vesículas isoladas se distribuíram na escala ≤ 100 nm, em ambas as condições experimentais, o que caracteriza as vesículas estudadas como EXOs segundo Colombo, Raposo e Théry (2014) e Ståhl *et al.*, (2019).

As imagens de TEM também revelam que o tratamento com GEM parece afetar a morfologia e estrutura dos EXOs liberados por PANC-1. Os EXOs das células tratadas apresentaram tamanhos menores, inclusive com estruturas aparecendo no limite de detecção do equipamento. Esses EXOs apresentam forma esférica e formam grandes aglomerados, no entanto, os mesmos são muito menos frequentes que aqueles observados nos EXOs isolados de células não tratadas. Os EXOs liberados pelas células não tratadas se mostraram maiores em tamanho, bem como, frequentemente aparecem nos campos formando aglomerados. Além disso, em vários campos do grid essas vesículas eram estruturas não esféricas. Em todas as imagens, para ambas condições as estruturas observadas e suas características estão de acordo com a literatura (Mincheva-Nilsson *et al.*, 2016). Mais experimentos são necessários para determinar se o efeito da droga sobre a estrutura e morfologia exossomal possui efeitos biológicos relevantes e sobre o conteúdo das vesículas.

A confirmação de alteração de tamanho dos EXOs causada pelo tratamento com GEM foi realizada em experimentos de DLS (do inglês “*dynamic light scattering*”). Apesar da existência de polidispersão amostral, muito provavelmente causada pelos aglomerados de vesículas, a média de tamanhos existente na amostra de vesículas isoladas das células não tratadas foi de 94,87 nm, enquanto que a média de tamanho das vesículas purificadas das células tratadas com GEM foi de 68,06 nm. É possível verificar que GEM interfere na estruturação dos EXOs, ainda a ser determinado se por resposta direta a ineterferência da droga nas vias de endossomos ou uma resposta celular controlada ao estresse quimioterápico.

O fenótipo secretório de ADP é muito bem caracterizado no que diz respeito à vesículas extracelulares, sendo considerado um tumor altamente secretório (Zhao *et al.*, 2017) bem como a linhagem de ADP PANC-1 (Valenzuela *et al.*, 2015). Nossos resultados corroboram com estes dados e demonstram que o tratamento com GEM (10 μ M 24 h),

possivelmente aumenta a secreção de EXO, uma vez que a quantificação indireta via quantificação de protpeinas por método de Bradford indica uma produção 40% maior de vesículas, rendendo 0,16 µg de proteína para cada mL de meio condicionado para as células não tratadas e 0,225 µg de proteína para cada mL de meio condicionado para as células tratadas com GEM. O aumento do fenótipo secretório pode ser uma resposta ao tratamento. Mais experimentos por metodologias de NTA (*nanotracking analysis*) são necessários para determinar se o aumento da proteína total obtida reflete na quantidade de EXOs obtida. No entanto, como observado pelas técnicas de microscopia eletrônica, os exossomos parecem ser muito mais abundantes nas células tratadas com GEM.

As duas principais barreiras que levam a alta taxa de mortalidade por ADP são o diagnóstico tardio e a resistência à drogas elevada dos casos mais avançados da doença. Estudos em biologia tumoral básica, como o apresentado neste trabalho, podem levar ao entendimento mais profundo dos mecanismos da doença, o que pode acarretar em uma melhora na qualidade de vida dos pacientes, bem como em opções de tratamento menos invasivas e mais eficazes. A literatura sobre comunicação celular em ADP ainda é pouco trabalhada e pode ser a chave para a criação de técnicas de diagnóstico avançadas e elucidação das ferramentas moleculares que levam à construção do fenótipo de resistência tumoral. Após nossas análises, pudemos determinar que no período em que GEM age sobre a célula, causando alterações morfológicas e possivelmente metabólicas, porém sem induzir morte celular, há indícios do aumento da secreção de EXOs. Além disso, a ação da droga provocou alterações na estrutura e organização dos mesmos, bem como uma considerável redução no tamanho. É possível que tal resposta seja acompanhada na alteração das moléculas carregadas por esses EXOs, e uma vez aumentada, seja responsável pela transmissão de sinais de estabelecimento de resistência. Investigações posteriores são necessárias para determinar o conteúdo dessas vesículas. Nosso trabalho revela uma resposta até então despercebida das células PANC-1 ao tratamento com GEM e cria base para estudos mais avançados em comunicação celular tumoral.

5. PERSPECTIVAS

- Finalizar a caracterização dos EXOs liberados pelas células PANC1 tratadas com GEM, através de NTA e Western Blot;
- Verificar os efeitos biológicos das vesículas isoladas, determinando efeitos de dose-dependência, possíveis efeitos em resistência à droga, etc;
- Analisar o conteúdo dos EXOs isolados através de abordagens proteômicas e análise de diferentes tipos de RNAs;
- Realizar experimentos com as demais doses testadas e determinar se existem relações de dose-dependência na resposta de PANC-1 a EXOs;
- Determinar se os efeitos de GEM se manifestam de forma aguda ou se mantêm após o tratamento;
- Realizar as análises em outras linhagens de ADP e determinar se a resposta é linhagem específica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPE, J. R. *et al.* Enhancement of Gemcitabine sensitivity in pancreatic adenocarcinoma by novel exosome-mediated delivery of the Survivin-T34A mutant. *J Extracell Vesicles*, v. 3, 2014. ISSN 2001-3078. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624263> >.

ANSARI, D.; GUSTAFSSON, A.; ANDERSSON, R. Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough. *World J Gastroenterol*, v. 21, n. 11, p. 3157-65, Mar 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25805920> >.

AWASTHI, N. *et al.* Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 10, p. 2361-9, Oct 2013. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803690> >.

BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 12, p. 897-909, Dec 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459728> >.

BATISTA, I. A.; MELO, S. A. Exosomes and the Future of Immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*, v. 20, n. 3, Jan 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699928> >.

BECKER, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, v. 30, n. 6, p. 836-848, Dec 2016. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27960084> >.

BOSMAN FT, CARNEIRO F, HRUBAN RH TN. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4 ed. Lyon: IARC Publications, 2018. 417 p.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. CÂNCER. 2018. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/>>. Acesso em: 13 set. 2018.

BUANES, T. A. Role of surgery in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, v. 23, n. 21, p. 3765-3770, Jun 2017. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638216> >.

CARUSO BAVISOTTO, C. *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Cell-Cell Communication in the Nervous System: Focus on Neurological Diseases. *Int J Mol Sci*, v. 20, n. 2, Jan 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30669512> >.

CASTRO-MARRERO, J. *et al.* Circulating extracellular vesicles as potential biomarkers in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: an exploratory pilot study. *J Extracell Vesicles*, v. 7, n. 1, p. 1453730, 2018. ISSN 2001-3078. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29696075> >

CHARRIER, A. *et al.* Connective tissue growth factor (CCN2) and microRNA-21 are components of a positive feedback loop in pancreatic stellate cells (PSC) during chronic pancreatitis and are exported in PSC-derived exosomes. *J Cell Commun Signal*, v. 8, n. 2, p. 147-56, Jun 2014. ISSN 1873-9601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464300> >.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 30, p. 255-89, 2014. ISSN 1530-8995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288114> >.

COSTA-SILVA, B. *et al.* Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*, v. 17, n. 6, p. 816-26, Jun 2015. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985394> >.

DE LA CRUZ, M. S.; YOUNG, A. P.; RUFFIN, M. T. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am Fam Physician*, v. 89, n. 8, p. 626-32, Apr 2014. ISSN 1532-0650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784121> >.

DE SOUSA CAVALCANTE, L.; MONTEIRO, G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*, v. 741, p. 8-16, Oct 2014. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25084222> >.

EL ANDALOUSSI, S. *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, v. 12, n. 5, p. 347-57, May 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584393> >.

ECKEL, F.; SCHMID, R. M. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer*, v. 96, n. 6, p. 896-902, Mar 2007. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17325704> >.

FAN, J. *et al.* Chemoresistance Transmission via Exosome-Mediated EphA2 Transfer in Pancreatic Cancer. *Theranostics*, v. 8, n. 21, p. 5986-5994, 2018. ISSN 1838-7640. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30613276> >.

FITENI, F. *et al.* Cisplatin/gemcitabine or oxaliplatin/gemcitabine in the treatment of advanced biliary tract cancer: a systematic review. *Cancer Med*, v. 3, n. 6, p. 1502-11, Dec 2014. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111859> >.

FRYER, R. A. *et al.* Mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer and sensitisation by the iMiD™ lenalidomide. *Anticancer Res*, v. 31, n. 11, p. 3747-56, Nov 2011. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110196> >.

FOGEL, E. L. *et al.* A Multidisciplinary Approach to Pancreas Cancer in 2016: A Review. *Am J Gastroenterol*, v. 112, n. 4, p. 537-554, 04 2017. ISSN 1572-0241. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28139655> >.

GESTO, D. S. *et al.* Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. *Curr Med Chem*, v. 19, n. 7, p. 1076-87, 2012. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257063> >.

HACKERT, T.; SCHNEIDER, L.; BÜCHLER, M. W. Current State of Vascular Resections in Pancreatic Cancer Surgery. *Gastroenterol Res Pract*, v. 2015, p. 120207, 2015. ISSN 1687-6121. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609306> >.

HAUSER, P.; WANG, S.; DIDENKO, V. V. Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol*, v. 1554, p. 193-200, 2017. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185192> >.

HEILER, S.; WANG, Z.; ZÖLLER, M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push. *World J Gastroenterol*, v. 22, n. 26, p. 5971-6007, Jul 2016. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468191> >.

HESSVIK, N. P.; LLORENTE, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*, v. 75, n. 2, p. 193-208, 01 2018. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28733901> >.

HIRSHBERG FOUNDATION. The Pancreas. Disponível em : < <http://pancreatic.org/> >. Acesso em : 26 jan 2019.

ISAJI, S. *et al.* International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*, v. 18, n. 1, p. 2-11, Jan 2018. ISSN 1424-3911. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191513> >.

JIN, H.; WU, Y.; TAN, X. The role of pancreatic cancer-derived exosomes in cancer progress and their potential application as biomarkers. *Clin Transl Oncol*, v. 19, n. 8, p. 921-930, Aug 2017. ISSN 1699-3055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28168600> >.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Cancer Observatory 2018. Disponível em : < <http://gco.iarc.fr/> >. Acesso em: 26 jan 2019.

JOHNS HOPKINS MEDICINE. The Sol Goldman Pancreatic Cancer Research Center. Disponível em: < <http://pathology.jhu.edu/> >. Acesso em: 26 jan 2019.

JUAN, T.; FÜRTHAUER, M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol*, v. 74, p. 66-77, 02 2018. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807885> >.

KANDA, M. *et al.* Mutant TP53 in duodenal samples of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer or high-grade dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v. 11, n. 6, p. 719-30.e5, Jun 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200980> >.

KANDEL, P.; WALLACE, M. B. Advanced EUS Guided Tissue Acquisition Methods for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, v. 10, n. 2, Feb 2018. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29463004> >.

KANJI, Z. S.; GALLINGER, S. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *CMAJ*, v. 185, n. 14, p. 1219-26, Oct 2013. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610017> >.

LI, P. *et al.* Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, v. 7, n. 3, p. 789-804, 2017. ISSN 1838-7640. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28255367> >.

LI, Y. J. *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*, v. 36, n. 1, p. 52, Jun 2017. ISSN 1944-446X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28646911> >.

LIN, C. Y. *et al.* A CT-guided fat transversing coaxial biopsy technique for pancreatic lesion biopsy that avoids major organs and vessels. *Saudi J Gastroenterol*, v. 23, n. 6, p. 341-347, 2017 Nov-Dec 2017. ISSN 1998-4049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29205187> >.

LU, J. *et al.* Exosomal tetraspanins mediate cancer metastasis by altering host microenvironment. *Oncotarget*, v. 8, n. 37, p. 62803-62815, Sep 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977990> >.

MAAS, S. L. N.; BREAKFIELD, X. O.; WEAVER, A. M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*, v. 27, n. 3, p. 172-188, 03 2017. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979573> >.

MAITRA, A. *et al.* Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol*, v. 12, n. 2, p. 81-91, Mar 2005. ISSN 1072-4109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731576> >.

MASAMUNE, A. *et al.* Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce activation and profibrogenic activities in pancreatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 495, n. 1, p. 71-77, 01 2018. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111329> >.

MASSOUMI, R. L. *et al.* Emerging Evidence for the Clinical Relevance of Pancreatic Cancer Exosomes. *Pancreas*, v. 48, n. 1, p. 1-8, Jan 2019. ISSN 1536-4828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30531240> >.

MCGUIGAN, A. *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*, v. 24, n. 43, p. 4846-4861, Nov 2018. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30487695> >.

MIKAMORI, M. *et al.* MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep*, v. 7, p. 42339, 02 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28198398> >.

MINCHEVA-NILSSON, L. *et al.* Isolation and Characterization of Exosomes from Cultures of Tissue Explants and Cell Lines. *Curr Protoc Immunol*, v. 115, p. 14.42.1-14.42.21, 11 2016. ISSN 1934-368X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27801511> >.

MOUTINHO-RIBEIRO, P. *et al.* Pancreatic cancer screening: Still a delusion? *Pancreatology*, v. 17, n. 5, p. 754-765, 2017 Sep - Oct 2017. ISSN 1424-3911. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28739291> >.

MUNIRAJ, T.; JAMIDAR, P. A.; ASLANIAN, H. R. Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. *Dis Mon*, v. 59, n. 11, p. 368-402, Nov 2013. ISSN 1557-8194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183261> >.

NUZHAT, Z. *et al.* Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer - liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget*, v. 8, n. 10, p. 17279-17291, Mar 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999198> >.

OTTENHOF, N. A. *et al.* Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Patholog Res Int*, v. 2011, p. 620601, Mar 2011. ISSN 2042-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512581> >.

PAPANDREOU, M. E.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease. *Biotechnol J*, v. 12, n. 1, Jan 2017. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27976834> >.

PATEL, G. K. *et al.* Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and miR-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, DCK. *Br J Cancer*, v. 116, n. 5, p. 609-619, Feb 2017. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28152544> >.

PLEET, M. L. *et al.* Autophagy, EVs, and Infections: A Perfect Question for a Perfect Time. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 8, p. 362, 2018. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30406039> >.

POMATTO, M. A. C. *et al.* Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Front Mol Biosci*, v. 4, p. 37, 2017. ISSN 2296-889X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28638822> >.

QIU, J. *et al.* Extracellular vesicles as mediators of the progression and chemoresistance of pancreatic cancer and their potential clinical applications. *Mol Cancer*, v. 17, n. 1, p. 2, 01 2018. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304816> >.

RICHARDS, K. E. *et al.* Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*, v. 36, n. 13, p. 1770-1778, 03 2017. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669441> >.

RIVA, F. *et al.* Clinical applications of circulating tumor DNA and circulating tumor cells in pancreatic cancer. *Mol Oncol*, v. 10, n. 3, p. 481-93, Mar 2016. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26856794> >.

ROBINSON, S. M. *et al.* The role of exosomes in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 75, p. 131-9, 06 2016. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27017975> >.

SINGH, M.; MAITRA, A. Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. *Pancreatology*, v. 7, n. 1, p. 9-19, 2007. ISSN 1424-3903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449961> >.

SONG, Y.; BABA, T.; MUKAIDA, N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 477, n. 3, p. 515-9, 08 2016. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311854> >.

STÅHL, A. L. *et al.* Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*, v. 34, n. 1, p. 11-30, Jan 2019. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29181712> >.

SUN, C. Y. *et al.* Scutellarin Increases Cisplatin-Induced Apoptosis and Autophagy to Overcome Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer via ERK/p53 and c-met/AKT Signaling Pathways. *Front Pharmacol*, v. 9, p. 92, 2018. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29487530> >.

SZATANEK, R. *et al.* The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 6, May 2017. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28555055> >.

TAI, Y. L. *et al.* Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*, v. 109, n. 8, p. 2364-2374, Aug 2018. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29908100> >.

TONG, H. *et al.* The benefits of modified FOLFIRINOX for advanced pancreatic cancer and its induced adverse events: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p. 8666, Jun 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29875415> >.

TYNG, C. J. *et al.* Computed tomography-guided percutaneous core needle biopsy in pancreatic tumor diagnosis. *World J Gastroenterol*, v. 21, n. 12, p. 3579-86, Mar 2015. ISSN 2219-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834323> >.

WEI, F. *et al.* Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Mol Cancer*, v. 16, n. 1, p. 132, 07 2017. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743280> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. International Agency For Research in Cancer. Global Cancer Observatory 2018. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

VALENZUELA, M. M. *et al.* Exosomes Secreted from Human Cancer Cell Lines Contain Inhibitors of Apoptosis (IAP). *Cancer Microenviron*, v. 8, n. 2, p. 65-73, Aug 2015. ISSN 1875-2292. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25982218> >.

YABAR, C. S.; WINTER, J. M. Pancreatic Cancer: A Review. *Gastroenterol Clin North Am*, v. 45, n. 3, p. 429-45, 09 2016. ISSN 1558-1942. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546841> >.

YAN, Y.; FU, G.; MING, L. Role of exosomes in pancreatic cancer. *Oncol Lett*, v. 15, n. 5, p. 7479-7488, May 2018. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29731898> >.

YANG, J. *et al.* Extracellular Vesicles as Carriers of Non-coding RNAs in Liver Diseases. *Front Pharmacol*, v. 9, p. 415, 2018. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29740327> >.

YONG-XIAN, G. *et al.* Gemcitabine inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *J Cancer Res Ther*, v. 12, n. Supplement, p. 1-4, Oct 2016. ISSN 1998-4138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721241> >.

ZHAO, C. *et al.* Pancreatic cancer and associated exosomes. *Cancer Biomark*, v. 20, n. 4, p. 357-367, Dec 2017. ISSN 1875-8592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29036786> >.

ZHOU, M. *et al.* Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cell Immunol*, v. 292, n. 1-2, p. 65-9, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290620> >.

ZHU, J. *et al.* Gemcitabine induces apoptosis and autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem*, v. 65, n. 5, p. 665-671, Sep 2018. ISSN 1470-8744. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29575133> >.

7. CURRICULUM VITÆ resumido

ROSA, S. A

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Solon Andrades da Rosa

Local e data de nascimento: Ibirubá, Rio Grande do Sul, Brasil. 19 de Julho de 1995.

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. AC Campus UFRGS. Agronomia. 91501970 - Porto Alegre, RS – Brasil.

Telefone profissional: (54) 9 9178-4412

E-mail: solondarosa_andrades@hotmail.com

2. FORMAÇÃO: bacharelado em Biotecnologia, habilitação Biotecnologia Molecular – UFRGS 2013 - 2016

3. ESTÁGIOS:

- aluno de iniciação científica: 2013/2 – 2016/2, Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, LFIMB – 220 Cbiot/UFRGS. Bolsista Capes. Orientador: Dra. Marilene Henning Vainstein. Projeto: caracterização e produção de uma lipase obtida a partir da levedura *pseudozyma hubeiensis* e aplicação em biocatálise de biodiesel.

- estágio curricular em Biotecnologia: 2016/2, Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, UAMP – Hospital de Clínicas de Porto Alegre HCPA/UFRGS. Supervisor: Ursula da Silveira Matte. Funções: Apoio em todas as atividades desenvolvidas na UAMP e serviços prestados.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES:

- Destaque da Sessão Biotecnologia Molecular, com Indicação ao Prêmio Jovem Pesquisador Ciências Biológicas 2016, XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- ROSA, S. A.; PEREIRA, J. E. ; NAPP, A. P. ; VAINSTEIN, M. H. . Anais do I Congresso de Biotecnologia da Região Sul: Cenário Atual e Perspectivas Futuras. In: I Congresso de Biotecnologia da Região Sul: Cenário Atual e Perspectivas Futuras, 2016, Lajeado. Anais do I Congresso de Biotecnologia da Região Sul: Cenário Atual e Perspectivas Futuras, 2016.

- Zeni da Silva, R., Andrades da Rosa, S., dos Santos Lobo, M., Colonetti Ferst, P., Rösner de Almeida, V., Cremonese Filippi Chiela, E. and Luciana da Costa Lopez,

P. (2018). Autophagy and exosome in pancreatic adenocarcinoma cells after gemcitabine treatment. In: XIX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. [online] São Paulo. Available at: <http://www.sbbc.org.br/wp-content/uploads/2014/08/Livro-ResumosSBBC2018.pdf> [Accessed 4 Jun. 2019].