

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Dissertação de Mestrado

**Investigação dos possíveis papéis de vesículas extracelulares e suas proteínas na
transferência intercelular de resistência à cisplatina em adenocarcinoma de
pulmão humano**

Helier Balbinotti da Silveira

Porto Alegre, setembro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Investigação dos possíveis papéis de vesículas extracelulares e suas proteínas na
transferência intercelular de resistência à cisplatina em adenocarcinoma de
pulmão humano**

Helier Balbinotti da Silveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, setembro de 2018.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a você, leitor, pelo interesse em ler o meu trabalho. Pode ter certeza que este trabalho foi feito com muito esforço, dedicação e animação. Custou tempo e cabelos, mas valeu a pena!

A minha orientadora, Prof^ª. Karina, agradeço muito pelas ideias e correções, por ter aceitado com empolgação meu pedido de orientação, mesmo sabendo das minhas dificuldades e desafios de tempo disponível e, principalmente, pela paciência. Perdi as contas de quantas mensagens de texto e e-mails eu enviei para ela. Eu cresci muito pessoal e profissionalmente, devo muito a ela!

Muito obrigado aos professores e professoras que ao longo da minha formação foram importantes para a construção do meu conhecimento e saber, em especial aos professores Henrique e Arnaldo por terem me apresentado a verdadeira ciência e por terem me conduzido e auxiliado na minha formação como um cientista.

Queria agradecer a gentileza das Prof^ªs Sidia e Vanessa em me ajudar nos testes estatísticos que foram de grande importância para o trabalho. Muito obrigado, Prof. Tiago Veit, pela importante ajuda na padronização de isolamento de vesículas e citometria. Agradeço aos alunos do Laboratório de Tecnologia Mineral e Ambiental pela disposição e ajuda com as NTAs que foram imprescindíveis para o estudo. À equipe do Uniprote-MS (CBiot) e do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS agradeço pelo suporte nas análises de LC-MS/MS e microscopia eletrônica/confocal.

Agradeço meus colegas do CREAL, que me apoiaram e incentivaram a fazer e concluir essa formação, assim como todos os meus colegas de laboratório, que com certeza contribuíram com o meu desenvolvimento pessoal e científico. Particularmente, agradeço a Edi pelas dicas, sugestões e convites de *happy hour*. Só não foi minha coorientadora, pois o detalhe burocrático não deixou. Agradeço também a Cris, Nina e Bruna pelos ensinamentos na cultura, inclusive pela paciência quando eu esquecia meu horário na cultura ou vidraria suja no banho. Gratidão, Tiago, pela linha de comando, essencial para análises de busca nos bancos de dados de vesículas.

Agradeço do fundo do meu coração a minha querida mãe, a Dona Belmira, que se não fosse por ela eu não teria nenhuma condição para lutar pelo meu estudo e formação. Agradeço-a todo o apoio, carinho, amor e mimos de uma mãe coruja batalhadora que sempre lutou para ter uma vida boa e digna. Tenho muito orgulho de ser seu filho.

Especialmente, quero agradecer meus gatos, Luna e Phoebe, pelas brincadeiras, carências e travessuras, que podem ter ajudado a desviar minha concentração e atenção, mas que também me deixaram mais relaxado e contente. Mais especialmente, muito obrigado, Juliana, meu amor. A pessoa que mais me aturou e que aguentou firme minhas noites e finais de semanas em claro, minhas queixas, dúvidas, reflexões, ausências. Se não fosse por você, tudo isso teria sido em vão e sem sentido! Te amo!

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a
entender.”*

(Marie Curie)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O câncer de pulmão	11
1.2 Cisplatina e resistência tumoral	14
Figura 1	16
Figura 2	18
Figura 3	20
1.3 Vesículas extracelulares e transferência de resistência.....	22
Figura 4.....	23
Figura 5	24
1.4 Justificativa	27
1.5 Objetivo geral	28
1.5.1 Objetivos específicos.....	28
2. MATERIAIS & MÉTODOS	29
2.1 Linhagens celulares e indução de resistência à CDDP	29
2.2 Ensaio de transferência e internalização de VEs pelas células A549	30
Figura 6	31
2.3 Cocultivo de células A549 e análise de transferência de quimiorresistência	31
2.4 Análise estatística dos dados de cocultivo	32
Figura 7	33
2.5 Isolamento de VEs secretadas por células A549	34
2.6 Caracterização das VEs liberadas <i>in vitro</i> pelas células A549	34
2.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
2.6.2 Citometria de fluxo	35
2.6.3 <i>Nanoparticle tracking analyses</i> (NTAs)	35
2.6.4 <i>Western blot</i> anti-CD63	35
2.7 Preparação de amostras para espectrometria de massas (LC-MS/MS)	36
2.8 Análise dos peptídeos por LC-MS/MS	37
2.9 Análises de bioinformática	37

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Linhagens celulares e indução de resistência à CDDP	39
Figura 8	40
Figura 9	41
3.2 Internalização de VEs e transferência de resistência entre células A549	42
Figura 10	43
Figura 11	46
Figura 12	47
3.3 Isolamento e caracterização das VEs de células A549 e RA-A549	50
Figura 13	51
Figura 14	52
3.4 Análise proteômica de VEs secretadas por células A549 e RA-A549	53
Figura 15	54
3.4.1 Análise de marcadores proteicos de VEs	55
3.4.2 Proteínas na fração <i>pellet</i> da amostra de VEs de células RA-A549	59
3.4.3 Análise de proteínas e termos de ontologias de VEs de células A549 sensíveis e resistentes potencialmente envolvidas na transferência de resistência a CDDP	61
Figura 16	62
Figura 17	63
3.4.3.1 Organização e modulação da estrutura da MEC	64
3.4.3.2 Modulação da cascata de sinalização do sistema complemento	69
3.4.3.3 Regulação da coagulação sanguínea e progressão tumoral	73
3.4.3.4 Transportadores de aminoácidos neutros e síntese de glutatona	76
3.4.3.5 Modulação do metabolismo energético de açúcares	78
3.4.3.6 Regulação proteolítica por sistema ubiquitina-proteassomo	81
3.4.3.7 Transição epitelial-mesenquimal (<i>epithelial-mesenchymal transition</i> , EMT)	83
3.4.3.8 Regulação negativa da transição de fase do ciclo celular	85
4. CONCLUSÕES	87
5. PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CURRICULUM VITAE resumido	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	do inglês, <i>American Cancer Society</i>
CDDP	cisplatina (do inglês, <i>cis-diamminedichloroplatinum(II)</i>)
EMT	do inglês, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FDA	diacetato de fluoresceína (do inglês, <i>fluorescein diacetate</i>)
GO	do inglês, <i>Gene Ontology</i>
gp-P	glicoproteína-P
IC₅₀	do inglês, <i>Inhibitory Concentration 50 %</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LC-MS/MS	do inglês, <i>liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>
MDR	do inglês, <i>Multidrug Resistance</i>
MEC	Matriz Extracelular
NCI	do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
NSCLC	do inglês, <i>non-small cell lung cancer</i>
NTA	do inglês, <i>nanoparticle tracking analysis</i>
PBS	do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>
R/S	cocultivo entre células resistentes e sensíveis a CDDP
RA-A549	resistência adquirida-A549
RA-A549_{sob}	resistência adquirida-A549_sobrenadante
RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S/S	cocultivo de células sensíveis a CDDP
SC	sistema complemento
SCLC	do inglês, <i>small cell lung cancer</i>
SFB	soro fetal bovino
SRB	sulforodamina B
VEs	vesículas extracelulares
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

RESUMO

Muitos pacientes com câncer de pulmão possuem tumores em estágio avançado, sendo que a principal droga utilizada para o seu tratamento é a cisplatina (CDDP). O uso da CDDP é limitado, pois tumores podem adquirir resistência a sua ação. Vesículas extracelulares (VEs) apresentam funções na transferência de quimiorresistência entre células tumorais, sendo que proteínas participam desse efeito. O estudo do perfil proteico de VEs de células tumorais sensíveis e resistentes a drogas permite compreender melhor os mecanismos dessa transferência. Portanto, este trabalho focou na investigação dos possíveis papéis de VEs e suas proteínas na transferência intercelular de resistência entre células humanas de adenocarcinoma de pulmão sensíveis e resistentes à CDDP. Sublinhagem celular com resistência (RA-A549) foi estabelecida, expondo a linhagem A549 a concentrações de CDDP. Após, foram realizados cocultivos *transwell* entre as células RA-A549 com células A549 para verificar a internalização celular de VEs e para avaliar a transferência de resistência entre as linhagens. No ensaio de transferência, células A549 foram cocultivadas com células A549 ou RA-A549 na presença ou não de CDDP por 72 h e, após, marcadas com FDA. As VEs foram isoladas do sobrenadante de cultivo pelo método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação e analisadas por diferentes técnicas. As proteínas de VEs isoladas de RA-A549 e A549 foram analisadas por LC-MS/MS. A sublinhagem RA-A549 apresentou valor de IC₅₀ superior ao da linhagem A549 (cerca de 4,5 vezes). Células A549 cocultivadas com RA-A549 foram capazes de internalizar as VEs de RA-A549 e apresentaram uma menor sensibilidade a CDDP ($p < 0,001$), sugerindo transferência intercelular de quimiorresistência. As VEs isoladas apresentaram diâmetro variável (10-420 nm), com predominância de ~100 nm, sendo que a sua presença foi ainda confirmada por detecção da proteína CD63. Foram identificadas 225 proteínas diferentes nas VEs das células A549 e RA-A549, entre essas, marcadores clássicos de VEs, como CD9, CD8, Alix, anexinas, Rab GTPases e HSPs. Foram identificadas proteínas nas VEs potencialmente envolvidas na transferência de resistência a CDDP e associadas com a proliferação e adesão celular, o bloqueio de fluxo da droga, invasão e migração celular, evasão de apoptose, atenuação do sistema imune e da coagulação, angiogênese, regulação do ciclo celular, o reparo de DNA, modulação do metabolismo energético, o efluxo ou a neutralização da droga, degradação proteica, reorganização da estrutura e formato das células tumorais.

ABSTRACT

Many patients with lung cancer have tumors in advanced stage and the main drug used for their treatment is cisplatin (CDDP). The CDDP use is limited, because tumors may become resistant to their action. Extracellular vesicles (EVs) have functions in chemoresistance transfer between tumor cells and proteins participate in this effect. The study of EVs protein profile from drug-sensitive and -resistant tumor cells allows a better understanding of the mechanisms of this transfer. Therefore, this work focused on the investigation of the possible roles of EVs and their proteins in the resistance intercellular transfer between CDDP-resistant and -sensitive lung adenocarcinoma human cells. Cell subline with resistance (RA-A549) was established, exposing the A549 line to CDDP concentrations. After, transwell co-cultures were performed between RA-A549 cells with A549 cells to verify EVs cell uptake and to assess the resistance transfer between the lines. In the transfer assay, A549 cells were co-cultivated with the A549 cells or RA-A549 with CDDP or not by 72 h and thereafter labeled with FDA. The EVs were isolated from culture supernatant by the differential centrifugation and ultracentrifugation method and analyzed by different techniques. The isolated EVs protein from RA-A549 and A549 were analyzed by LC-MS/MS. The RA-A549 subline showed IC₅₀ value greater than of A549 line (about 4.5 fold). A549 cells co-cultivated with RA-A549 were able to RA-A549 EVs uptake and showed a lower sensitivity to CDDP ($p < 0,001$), suggesting chemoresistance intercellular transfer. The isolated EVs showed a variable diameter (10-420 nm) with a predominance of ~100 nm, and their presence was further confirmed by detection of CD63 protein. Two hundred and twenty-five different proteins were identified in the A549 and RA-A549 cell EVs, among these EVs classic protein markers, such as CD9, CD8, Alix, annexins, Rab GTPases e HSPs. Proteins were identified in the EVs potentially involved in the CDDP-resistance transfer and associated with cell proliferation and adhesion, drug flow blockage, cell invasion and migration, apoptosis evasion, attenuation of immune system and coagulation, angiogenesis, cell cycle regulation, DNA repair, modulation of energy metabolism, efflux or neutralization of the drug, protein degradation, reorganization of the tumor cell structure and shape.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de pulmão

O termo câncer é utilizado na medicina para definir um amplo grupo de doenças multifatoriais, caracterizadas genericamente por apresentarem um crescimento anormal de células além dos seus limites teciduais, desenvolvendo uma massa de tecido chamada tumor. As células tumorais podem invadir tecidos adjacentes ou se propagarem para tecidos distantes por meio de vasos sanguíneos ou linfáticos, processo conhecido como metástase. As causas para o desenvolvimento de um câncer são diversas, incluindo fatores genéticos e agentes físicos, químicos e biológicos (NCI, 2012; WHO, 2016).

Globalmente, são diagnosticados diferentes tipos de câncer, de modo que as estimativas apontam o câncer de pulmão como o tipo de câncer mais comum, tanto em números de casos quanto de mortes consequentes da doença. O câncer de pulmão é o câncer mais comum no mundo entre os homens e o segundo de maior frequência entre as mulheres, neste caso perdendo a posição apenas para o câncer de mama (Jemal *et al.*, 2010; GLOBOCAN, 2012; Ferlay *et al.*, 2015). Estimativas da incidência de câncer nos Estados Unidos no ano de 2018 apontam o câncer de pulmão como sendo o segundo tipo de tumor mais frequente em novos casos e o primeiro em maior número de mortes decorrentes da enfermidade, tanto em homens quanto em mulheres (Siegel *et al.*, 2018). No Brasil, as estimativas para o biênio 2018-2019 indicam o câncer de pulmão como o segundo tumor mais incidente em homens e o quarto no sexo feminino, com mais de 30.000 novos casos da doença estimados para o ano de 2018 somando-se ambos os sexos. As estimativas para o Estado do Rio Grande do Sul colocam o câncer de pulmão na posição de segundo mais incidente entre homens e o terceiro entre mulheres, sendo um dos Estados do Brasil com maior prevalência, em ambos os sexos (INCA, 2017).

Em uma análise temporal de casos de câncer de pulmão obtida a partir de dados de 15 anos consecutivos oriundos de diferentes fontes, verificou-se que em muitos países a incidência desse câncer em homens ficou estável ou teve um declínio. Além disso, o único país que mostrou uma tendência de aumento de casos de câncer de pulmão em homens foi o Brasil; no caso da incidência em mulheres, todos os países avaliados tiveram aumento do número de casos da doença e o Brasil apresentou a maior tendência (Wong *et al.*, 2017). Em relação à mortalidade do câncer de pulmão, os dados deste estudo mostram que o Brasil, juntamente com outros países, apresentou um aumento de mortalidade de pacientes do sexo feminino. Esses dados são corroborados por Guerra *et al.* (2017), os quais analisaram as taxas de mortalidade de câncer no Brasil no período de 1990 a 2015 utilizando estimativas de *Global Burden of Disease (GBD 2015 mortality and causes of death collaborators, 2016)*. Esse estudo demonstrou que no caso do câncer de pulmão há o indicativo de redução de mortalidade entre homens e, em contraste, um aumento de mortes entre mulheres. Essas estimativas de mortalidade estão de acordo com as análises de Malta *et al.* (2016), utilizando dados de mortes decorrentes de câncer de pulmão entre 1996-2011 notificados e disponíveis pelo Departamento de Informação do Sistema de Saúde Unificado do Brasil.

O câncer de pulmão é uma doença caracterizada por apresentar células tumorais localizadas no epitélio respiratório humano (brônquios, bronquíolos e alvéolos). Histologicamente apresenta dois tipos principais nomeados como câncer de pulmão de células pequenas (*small cell lung cancer*– SCLC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (*non-small cell lung cancer*– NSCLC). O segundo tipo, NSCLC, é subdividido em três tipos celulares principais, carcinoma de células escamosas, o carcinoma de células grandes e o adenocarcinoma, os quais diferem em tamanho, forma

e composição química. Os tumores pulmonares podem apresentar um tipo celular único ou uma mistura de diferentes tipos (NCI, 2012; Horn *et al.*, 2017).

O NSCLC é o tipo mais comum de câncer de pulmão, correspondendo a cerca de 85% dos casos (Molina *et al.*, 2008). Com relação aos subtipos de NSCLC, o carcinoma escamoso era o mais frequentemente notificado, contudo estudos mais recentes indicam um aumento de casos de adenocarcinoma, tornando esse subtipo mais recorrente. O menor consumo de cigarros e as modificações na composição dos mesmos são atribuídos como possíveis causas na inversão das frequências dos dois subtipos de câncer de pulmão mencionados (Boyle & Lewin, 2008). Adenocarcinoma também é forma mais comum de câncer de pulmão entre pessoas não-fumantes, mulheres e adultos com menos de 60 anos (Horn *et al.*, 2017).

Embora existam outros fatores que aumentam o risco de desenvolver câncer de pulmão, o uso de tabaco é reconhecido como a principal causa (Horn *et al.*, 2013). Ser fumante passivo, apresentar uma dieta pobre em frutas e vegetais, exposição à poluição do ar, exposição a agentes cancerígenos (amianto e arsênico, por exemplo), exposição à radiação ionizante e outras doenças pulmonares, são outros fatores que podem contribuir para o aumento do risco de desenvolver tumores pulmonares (Molina *et al.*, 2008). Além disso, mutações germinativas em determinadas regiões dos genes TP53 e EFGR (*epidermal growth factor receptor*) e nos loci 5p15, 15q25.1 e 6p21, entre outras regiões gênicas, têm sido associadas à maior susceptibilidade em desenvolver câncer de pulmão entre famílias estudadas (Horn *et al.*, 2013).

O tratamento de pessoas com câncer de pulmão consiste basicamente na remoção cirúrgica do tumor, radioterapia, quimioterapia e/ou terapia contra alvos específicos, como inibidores de EGFR (Molina *et al.*, 2008). Um tipo ou um combinado

de diferentes tipos de tratamento pode ser utilizado, dependendo do tipo de câncer diagnosticado e o estágio em que se encontra (Provencio *et al.*, 2011). O tratamento mais comum para o câncer de pulmão de células pequenas (SCLC) é a quimioterapia, podendo ser combinada com radioterapia. Já o NSCLC pode ser tratado com cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou com uma combinação de tratamentos (Horn *et al.*, 2017).

Usualmente, as características que indicam a suspeita de câncer de pulmão em pacientes são radiografias do tórax anormais, sintomas localizados ou efeitos sistêmicos devido à formação do tumor (Rivera *et al.*, 2013). O prognóstico da doença é pobre, pois na maioria dos casos os pacientes são diagnosticados com tumores em fase avançada ou com metástases (Berghmans *et al.*, 2011). Muitos dos pacientes em estágio avançado da doença apresentam tumores inoperáveis, de modo que a quimioterapia é o tratamento padrão mais utilizado nesses casos (Provencio *et al.*, 2011).

1.2 Cisplatina e resistência tumoral

A quimioterapia contra o câncer de pulmão pode ser utilizada isolada, assim como adjuvante a outros tratamentos (ACS, 2015). A quimioterapia utilizada no processo pré-operatório para remoção do tumor pulmonar pode ser importante e efetiva no combate à doença, aumentando a sobrevivência dos pacientes e o tempo de recorrência do tumor (NSCLC Meta-analysis Collaborative Group, 2014). Tal tratamento é benéfico, como terapia paliativa, nos casos de doentes em estágio avançado e/ou diagnosticados com metástases. Geralmente, a quimioterapia é realizada utilizando-se dois tipos de drogas em conjunto, sendo uma delas derivada de complexo metálico de platina, tal como a cisplatina e a carboplatina (Pfister *et al.*, 2004; ACS, 2015).

Os efeitos antitumorais da cisplatina (também nomeada de cis-diamminedichloroplatinum(II) ou pela sigla CDDP) foram analisados no início dos anos

70 em sarcoma e leucemia (Alderden *et al.*, 2006; Chabner, 2010). Embora existam diversos fármacos quimioterápicos, a CDDP é uma das drogas mais interessantes, sendo utilizada no tratamento de diferentes tipos de câncer, tais como câncer de testículo, de ovário, de cabeça e pescoço e de pulmão. No caso de câncer de pulmão, a CDDP é a droga chave no tratamento do SCLC, enquanto é muito utilizada como adjuvante no tratamento após a remoção cirúrgica ou radioterapia de tumor do tipo NSCLC (Basu & Krishnamurthy, 2010; Dasari & Tchounwou, 2014). A sobrevivência de pacientes com NSCLC que sofreram ressecção cirúrgica completa é aumentada quando se utiliza a CDDP como tratamento adjuvante (Arriagada *et al.*, 2004). Em especial, a CDDP é a principal droga utilizada no tratamento de NSCLC em pacientes com tumores em estágio avançado, lembrando que nesses casos os tumores são inoperáveis, logo a quimioterapia é a única opção de tratamento possível (Rose *et al.*, 2014).

O principal efeito citotóxico da CDDP é causar dano ao DNA das células cancerígenas, de modo a bloquear a divisão celular e induzir a apoptose celular. A CDDP se liga ao DNA, causando a formação de adutos, que ocasionam a inibição da replicação do DNA, bem como a supressão do processo de transcrição do DNA e a ativação de várias vias de transdução de sinal. Por fim, esses efeitos culminam no processo de reparo do dano e/ou de apoptose celular (**Figura 1**) (Siddik, 2003; Basu & Krishnamurthy, 2010; Dasari & Tchounwou, 2014). A transdução de sinal à resposta ao dano no DNA é mediada via p53 e c-Abl, sendo que a ativação de p53 leva à indução de p21, GADD5, PUMA α pró-apoptótico, caspase 6 e 7, e miR-34a. Além disso, p53 promove apoptose por ligação e inibição de Bcl-xL e também por degradação de FLIP, ambos reguladores de apoptose. Adutos de DNA-CDDP também ativam o sistema de reparo de incompatibilidade, o qual ativa c-Abl, levando a ativação de JNK e p38

MAPK, assim como a estabilização de p73 resultando em apoptose (Basu & Krishnamurthy, 2010).

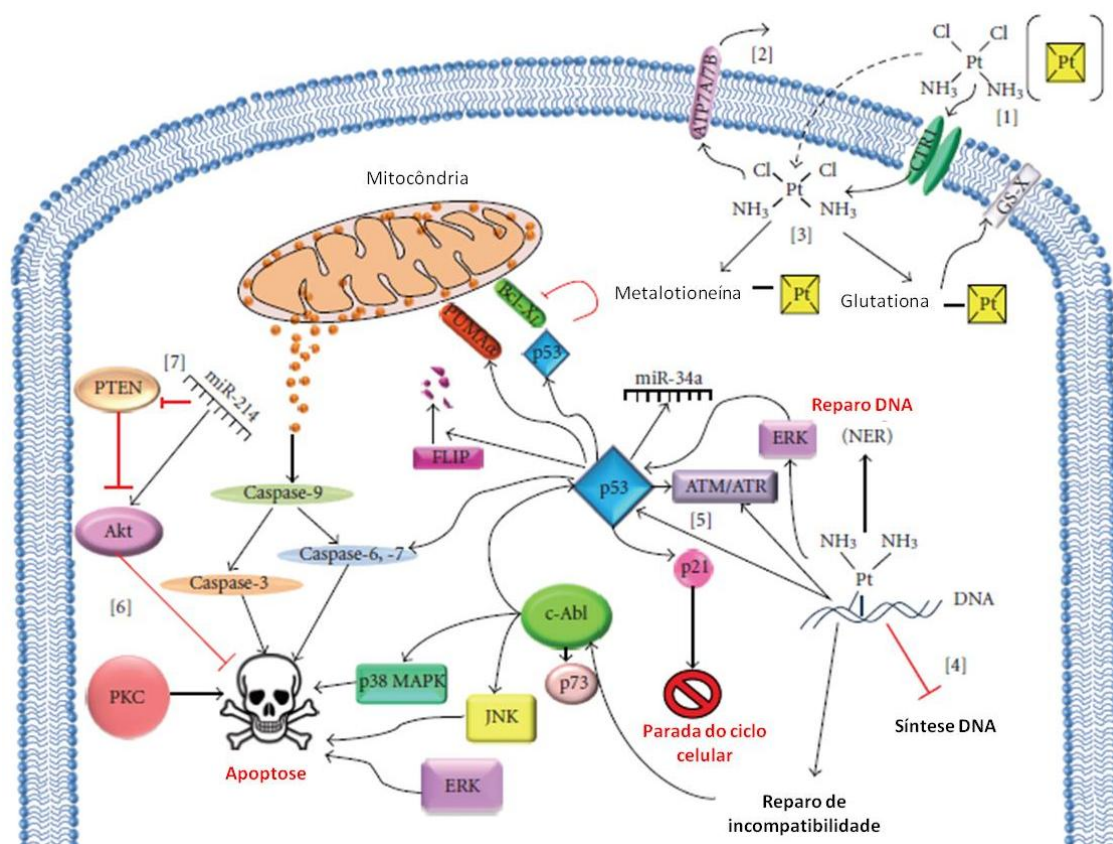


Figura 1. Ilustração esquemática dos efeitos citotóxicos causados pelo dano no DNA induzido pela CDDP. [1] Entrada de CDDP na célula por difusão passiva (setas pontilhadas) ou transporte mediado por transportador (CTR1, *copper transporter-1*). [2] Efluxo de CDDP por transportadores ATP7A e ATP7B. [3] Ligação de CDDP a grupos tióis, metalotioneína e glutatona. Os conjugados CDDP–glutaciona são exportados da célula por bombas de GS–X. [4] A CDDP impede a proliferação celular por inibir a síntese de DNA, seguida por ativação de resposta ao dano ao DNA. [5] Adutos de DNA–CDDP são reparados via sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*) e também induzem parada do ciclo celular. [6] Regulação da morte celular por quinases, tais como PKC, ERK e Akt. [7] miR-214 promove resistência a CDDP por regulação negativa de PTEN e ativação de Akt. Imagem modificada de Basu & Krishnamurthy (2010).

Embora a formação de adutos de DNA seja bem aceito como o mecanismo inicial e principal da ação antitumoral da CDDP, estudos sugerem que essa droga pode ter outros alvos moleculares, como proteínas de membrana (Rebillard *et al.*, 2007), DNA e proteínas mitocondriais (Yang *et al.*, 2006b; Ozaki *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014), componentes do citoesqueleto (Zeidan *et al.*, 2008), enzimas (Kilpin & Dyson,

2013) e diversas proteínas (Messori & Merlino, 2014) e RNAs ribossômicos (Melnikov *et al.*, 2016).

O sucesso no uso terapêutico da CDDP é limitado, devido aos efeitos tóxicos da droga, os quais limitam a dose utilizada no tratamento, e também pela resistência (intrínseca ou adquirida) das células tumorais ao efeito citotóxico da droga (Basu & Krishnamurthy, 2010). Muitos mecanismos estão envolvidos na resistência à CDDP, os mais conhecidos envolvem a diminuição do influxo e aumento do efluxo da droga, aumento no reparo do DNA e na tolerância do dano ao DNA, e modificações nas vias de sinalização relacionadas a apoptose (**Figura 2**) (Siddik, 2003; Kelland, 2007).

Estudos de resistência a CDDP em linhagens celulares indicam que essa resistência pode ser mediada por dois mecanismos gerais: a) falha na entrada da quantidade necessária de CDDP no núcleo da célula tumoral, gerando assim, dano insuficiente ao DNA; b) falha no processo de morte celular após a ligação da droga ao DNA (Kelland, 2007). Muitas células com fenótipo resistente apresentam alterações nas vias de absorção da droga, de reconhecimento e reparo de dano no DNA e de apoptose. A maioria dos mecanismos de resistência descritos envolve a redução na absorção e o aumento do efluxo do quimioterápico, processos mediados pelo transportador CTR1, ATPases como ATP7A/ATP7B e membros da família ABC de transportadores, como MRP2; além da inativação da droga por conjugação com GSH, γ -GCS, GST e metalotioneínas; e o aumento da capacidade de reparo a danos no DNA, por meio dos membros da via de reparo por excisão de nucleotídeos como ERCC1 ou pelo mecanismo de recombinação homóloga com a participação dos supressores tumorais BRCA1 e BRCA2 (Siddik, 2003; Kelland, 2007; Basu & Krishnamurthy, 2010; Shen *et al.*, 2012).

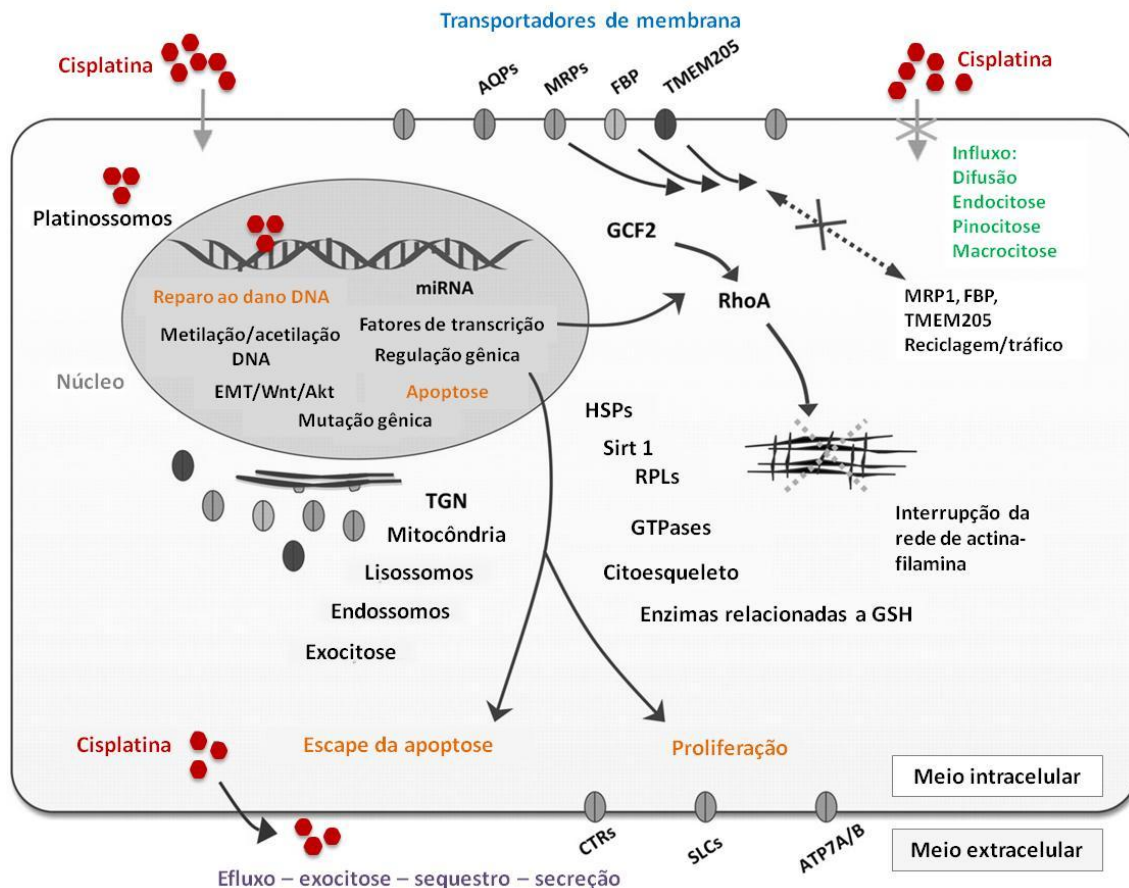


Figura 2. Ilustração esquemática dos mecanismos de defesa celular envolvidos com a resistência a droga CDDP. A ligação da CDDP ao DNA desencadeia a ativação ou silenciamento de vias regulatórias de genes relacionados ao reparo de dano no DNA, metilação do DNA, acetilação de histonas, miRNAs, EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), Wnt, fatores de transcrição e apoptose, além da indução de mutações gênicas. A falta de transportadores na membrana plasmática, como MRP1, FBP e TMEM205, resulta na expressão do fator de transcrição GCF2, o qual silencia a expressão de RhoA, interrompendo a montagem e/ou organização da rede de actina/filamina do citoesqueleto. HSPs, Sirt1, RPLs (*Ribosomal proteins*) e enzimas relacionadas à GSH podem atuar na regulação da resposta celular e detoxificação da CDDP. Imagem modificada de Shen *et al.* (2012).

A correlação da expressão da proteína transmembrana glicoproteína-P (gp-P) com a resistência à CDDP é bem evidente, contudo seu papel na quimiorresistência não está bem claro. A gp-P é uma bomba de efluxo de muitas drogas, porém a CDDP não é um substrato de transporte da gp-P. Dessa forma, pesquisadores sugerem que a gp-P possa exercer papel independente da atividade de efluxo na quimiorresistência a CDDP, como, por exemplo, inibição da atividade de caspases (Siddik, 2003; Breier *et al.*,

2013). Outros estudos indicam a proteína transmembrana TMEM205 e o transportador Glut1 como alvos associados à resistência de células a CDDP (Shen *et al.*, 2012; Dasari & Tchounwou, 2014).

No câncer de pulmão, estudos têm demonstrado que proteínas relacionadas com mecanismos de resistência a CDDP podem estar envolvidas nos mais diversos processos biológicos. Nessa relação foram relatadas proteínas de transporte, de detoxificação, de sinalização de apoptose, antiapoptóticas, de proteassomas, de composição ou ligação ao citoesqueleto e de ligação a nucleotídeos, íons cálcio, ATP, ou moléculas do sistema imune (Kasahara *et al.*, 1991; Young *et al.*, 2001; Okouoyo *et al.*, 2004; Shanker *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011a; Becker *et al.*, 2014).

No conjunto, a ação da CDDP no combate às células tumorais se deve a efeitos complementares e interconectados que envolvem a regulação de vias de sinalização celular, tais como MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), JNK (*Jun amino-terminal kinase*), modulação de cálcio, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), β -catenina, NER (*Nucleotide Excision Repair*), ativação de p53, PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)/Akt (*Protein Kinase B*, PKB), entre outras. Essas vias, em suma, modulam os processos de reparo de DNA, interrupção ou progressão do ciclo celular e de apoptose. Alterações na regulação dessas vias estão associadas à indução de fenótipo de resistência em células de adenocarcinoma de pulmão (Wang *et al.*, 2000; Dasari & Tchounwou, 2014; Enoiu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016a, 2016b; Sarin *et al.*, 2017; Achkar *et al.*, 2018).

Ao discutirmos os fatores que levam a resistência tumoral, devemos ter em mente que um tumor é um conjunto populacional de células heterogêneas. O tumor interage com um microambiente celular chamado de estroma tumoral, composto de

diferentes células tais como fibroblastos, células endoteliais e mesenquimais, adipócitos, células-tronco e um conjunto de células originadas do sistema inflamatório e imunológico (**Figura 3**). Portanto, essa complexidade pode estar direta ou indiretamente envolvida na modulação da transformação das células tumorais sensíveis em células resistentes a determinados quimioterápicos, através da expressão e secreção diferencial de fatores capazes de se disseminarem entre as células (Castells *et al.*, 2012; Obenauf *et al.*, 2015).

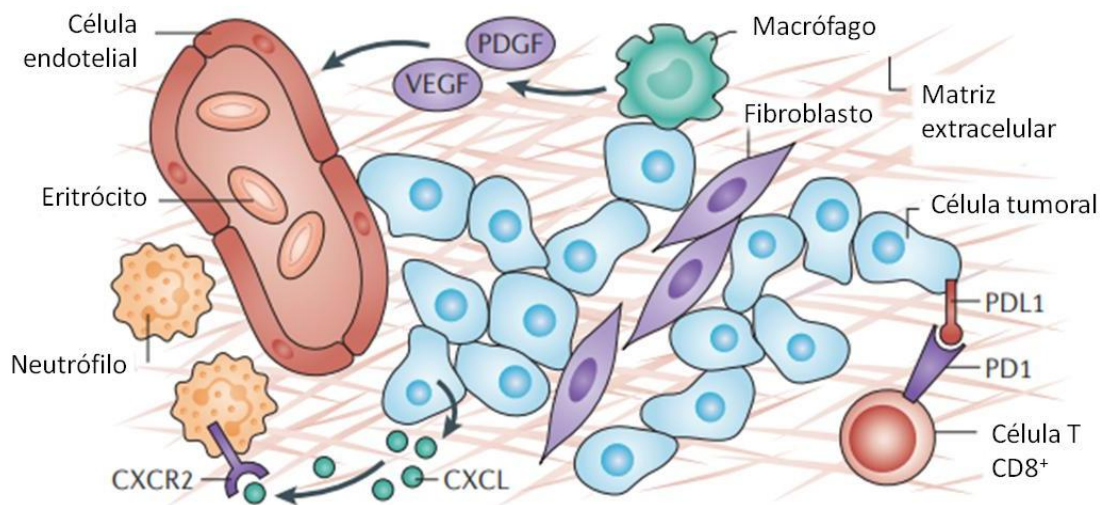


Figura 3. Ilustração esquemática de células e moléculas presentes no microambiente do câncer de pulmão. Como exemplos de sinalização parácrina são apresentados a secreção de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) que induzem o recrutamento de novas células endoteliais, o recrutamento de neutrófilos através de secreção de CXCL (*CXC-chemokine ligand*) pelas células tumorais e a expressão de PDL1 (*Programmed cell Death 1 Ligand 1*), molécula de atenuação da resposta citotóxica das células T. Imagem modificada de Chen *et al.* (2014).

Estudos indicam que existem diversos mecanismos associados com a aquisição de resistência pelas células no microambiente tumoral: interações das células com a matriz extracelular e interações célula-célula, influenciando processos antiapoptóticos; liberação de fatores solúveis entre as células tumorais e o estroma, relacionados com a sobrevivência e crescimento do tumor; formação de nichos apropriados que favoreçam a

obtenção de resistência; ou ainda a conversão de células cancerígenas em células de iniciação tumoral (chamadas de células-tronco tumorais) (Castells *et al.*, 2012).

Diferentes tipos celulares do estroma tumoral são capazes de modular a resistência inata na terapia com drogas anticâncer devido à secreção de fatores de crescimento e moléculas capazes de ativar cascatas de sinalização como MAPK e PI3K-Akt. Além disso, a secreção de fatores solúveis pelas células do microambiente tumoral pode atuar na reprogramação celular, com a finalidade de favorecer o desenvolvimento de resistência (Straussman *et al.*, 2012; El-Badawy *et al.*, 2017). Fatores solúveis específicos secretados por células de adenocarcinoma de pulmão podem desempenhar funções parácrinas que levam à quimiorresistência a CDDP, tais como proteínas reguladoras do reparo do DNA e da apoptose, destacando o papel de citocinas nesses processos (Wang *et al.*, 2007; Kuang *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015).

Muitos estudos indicam que vesículas extracelulares liberadas pelas células tumorais possuem um papel muito importante no avanço do câncer, estando envolvidas tanto no processo de evasão da apoptose quanto do sistema imunológico. Além disso, vesículas podem contribuir para o crescimento tumoral e formação das metástases, aumentando assim a possibilidade de transformação maligna (Jorfi & Inal, 2013). As vesículas extracelulares são um veículo de comunicação intercelular muito importante por carregarem uma grande variedade de moléculas celulares. Essas moléculas podem ser proteínas, mRNAs (RNA mensageiros), miRNAs (microRNAs), DNA, lipídios e fatores de transcrição, moléculas-chave com funções dinâmicas na modulação do microambiente tumoral, com capacidade de regular os perfis de sensibilidade e resistência a drogas antineoplásicas (Fujita *et al.*, 2016; Giallombardo *et al.*, 2016).

1.3 Vesículas extracelulares e transferência de resistência

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas celulares delimitadas por uma bicamada lipídica, secretadas por diferentes células eucarióticas para o espaço extracelular (**Figura 4**). As VEs podem ser divididas e classificadas em três grupos, com base nos critérios de origem subcelular e diâmetro da vesícula: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Raposo & Stoorvogel, 2013; Colombo *et al.*, 2014). Exossomos consistem no tipo de VE mais bem estudado, com diâmetro entre 40 a 100 nm, cuja formação celular interna se dá a partir de endossomos multivesiculares, os quais quando fusionados à membrana plasmática causam a liberação dos exossomos (Raposo & Stoorvogel, 2013). As microvesículas, também conhecidas como ectossomos ou oncosomos, apresentam diâmetro de 100 a 1000 nm e são formadas, maturadas e liberadas por evaginação ou brotamento da membrana plasmática da célula. Já os corpos apoptóticos são vesículas maiores que 5000 nm de diâmetro, as quais são liberadas como bolhas de membrana em células em apoptose (O’loghlen, 2018).

As VEs são elementos importantes em processos patológicos, tais como no desenvolvimento de células tumorais. As vesículas são capazes de modular o microambiente celular, a fim de torná-lo mais favorável para o desenvolvimento de novos tumores, contribuindo para a formação de metástases. Além disso, as VEs são também capazes de atenuar e modular a resposta imunológica em decorrência da doença, facilitando o crescimento tumoral e sua disseminação (Jorfi & Inal, 2013; Tickner *et al.*, 2014).

Na resistência tumoral a quimioterápicos, as VEs apresentam funções relevantes na alteração tanto do microambiente local como sistêmico, incluindo o recrutamento e ativação de fibroblastos, o que reflete na modulação da matriz celular para dar suporte à

progressão tumoral (Kahlert& Kalluri, 2013). VEs liberadas por células tumorais possuem enzimas envolvidas nos mecanismos de apoptose, como as caspases, de modo que a liberação vesicular pode evitar o processo de morte celular (Jorfi& Inal, 2013). Por meio da sinalização mediada por exossomos, células tumorais são capazes de inibir o efeito antitumoral do sistema imune através de moléculas imunossupressoras presentes nas vesículas (Frydrychowicz *et al.*, 2015).

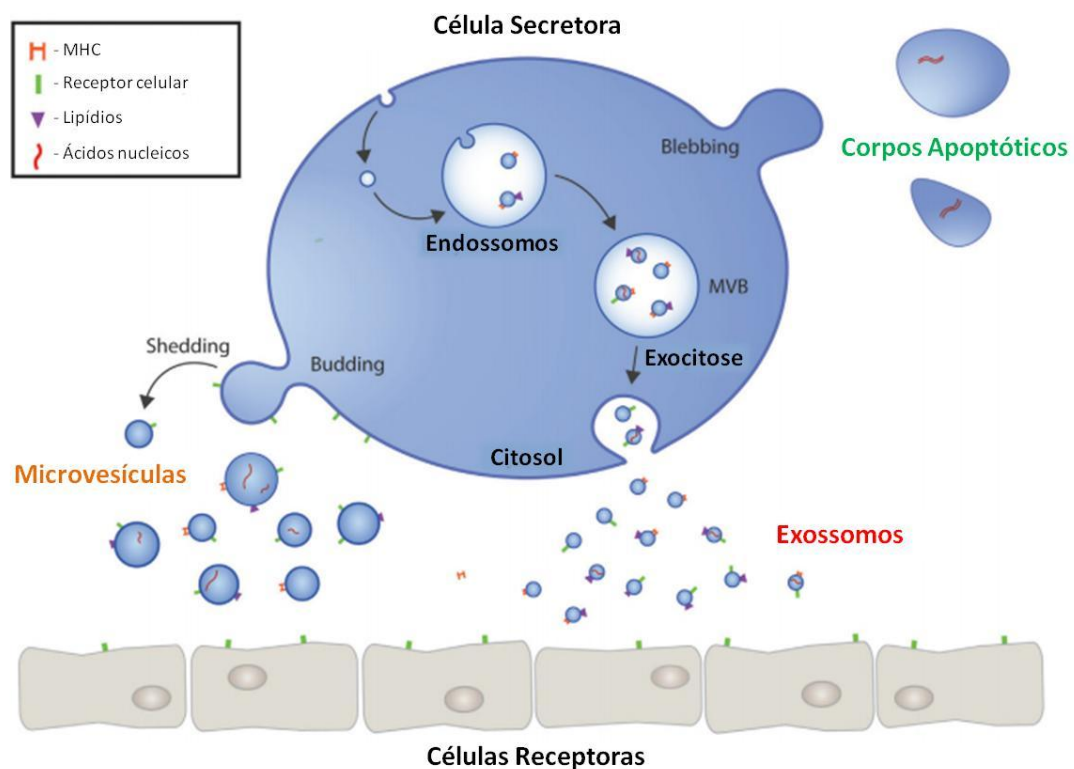


Figura 4. Representação esquemática da biogênese e secreção das vesículas extracelulares. MVB – *Multivesicular body* (corpo multivesicular). Imagem modificada de Gustafson *et al.* (2017).

Apesar da formação celular diferente, as VEs possuem internamente um conjunto de moléculas comuns, as quais são necessárias para a sua síntese, estrutura e migração (**Figura 5**). As VEs são compostas por elementos específicos da célula de origem, o que provavelmente reflete a função biológica da mesma (Simpson *et al.*, 2008).

Estudos têm sido realizados para identificar os componentes moleculares envolvidos na transferência de informação entre células cancerígenas resistentes e sensíveis a quimioterápicos via VEs. Esses estudos do conteúdo das VEs têm demonstrado que essa comunicação pode ocorrer por meio de proteínas ou ácidos nucleicos, como mRNAs e miRNAs. Uma variedade de proteínas é reconhecida como participantes da comunicação celular, de modo que há proteínas que podem atuar como promotoras ou supressoras tumorais (Azmi *et al.*, 2013).

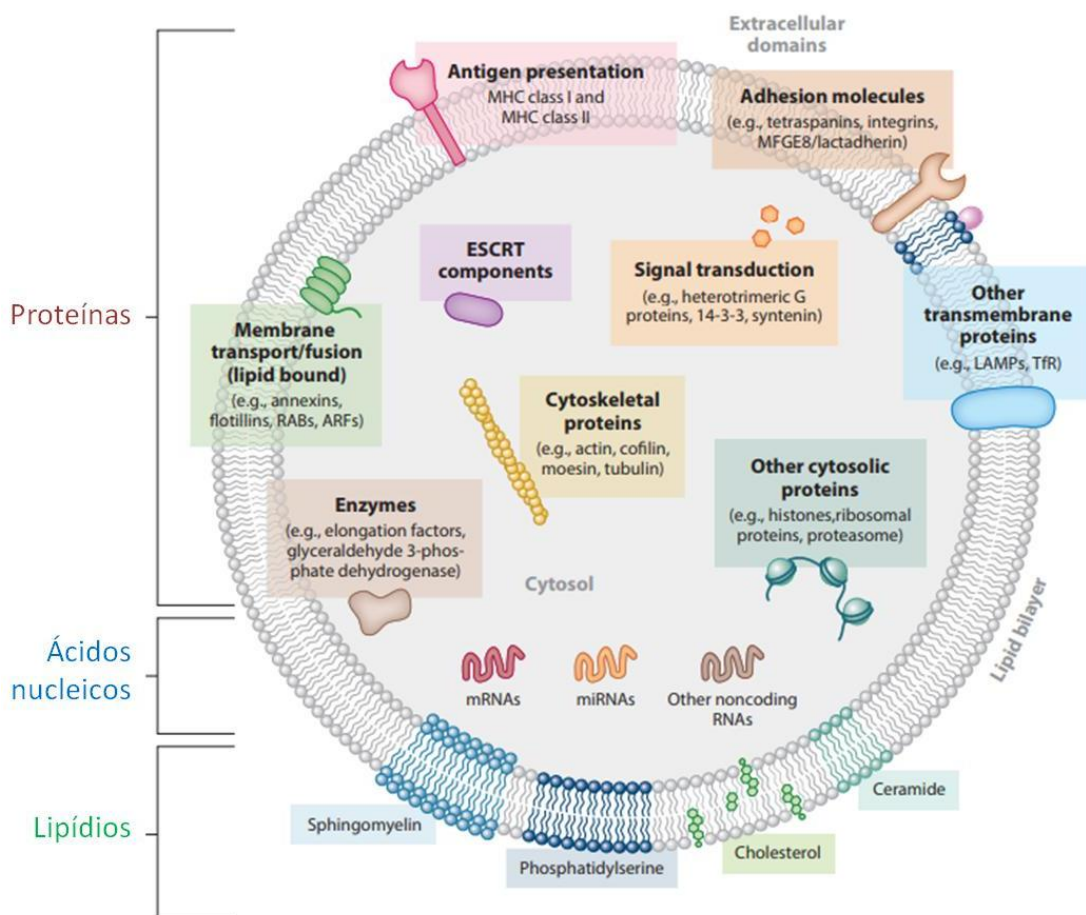


Figura 5. Representação esquemática da composição (famílias de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) das vesículas extracelulares. ARF – *ADP ribosylation factor*; ESCRT – *Endosomal sorting complex required for transport*; LAMP – *Lysosome-associated membrane protein*; MHC – *Major histocompatibility complex*; MFGE8 – *Milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII*; RAB – *Ras-related proteins in brain*; Tfr – *Transferrin receptor*. Imagem modificada de Colombo *et al.* (2014).

Diversos estudos relataram a transferência da gp-P, proteína conhecida e já citada como sendo um fator relacionado com a resistência a drogas, entre elas a CDDP,

em distintas linhagens tumorais (Bebawy *et al.*, 2009; Pasquier *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2015). Jaiswal *et al.* (2013) demonstraram *in vivo* que a transferência de resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistance*) por meio de VEs pode ocorrer sem pressão seletiva. A transferência da glicoproteína-P por meio de VEs entre linhagens celulares diferentes apresentou seletividade de tecido receptor, sendo que a efetiva transferência provavelmente depende dos tipos de moléculas de superfície das vesículas que interagem com as células receptoras.

Xiao *et al.* (2014) demonstraram *in vitro* que células da linhagem celular A549 de adenocarcinoma de pulmão quando submetida ao tratamento com CDDP são capazes de se comunicar por meio de exossomos, influenciando no aumento de quimiorresistência das mesmas. Os autores demonstraram que a resistência a CDDP pode ser mediada por miRNAs e mRNAs, e, além disso, sugerem que a inibição da formação de exossomos poderia ser um método alternativo para o tratamento do câncer de pulmão. Qin *et al.* (2017b) demonstraram que a incubação de exossomos isolados de células A549 resistentes a CDDP com uma população de células A549 de fenótipo sensível induziu um aumento significativo do IC₅₀ dessas células e reduziu as taxas de apoptose das mesmas. Esses dados sugerem a transferência de resistência por meio dessas vesículas e uma provável correlação com a expressão diferencial de miRNAs.

Estudos proteômicos comparativos de VEs secretadas por células tumorais sensíveis e resistentes a quimioterápicos podem identificar proteínas potencialmente envolvidas na transferência de quimiorresistência. Pokharel *et al.* (2014) identificaram proteínas exclusivas em VEs de células de câncer de mama com fenótipo MDR em comparação com as VEs de células sensíveis a droga, sendo muitas proteínas já relacionadas com o câncer e/ou com MDR. Os autores sugerem que a transferência de resistência a drogas é facilitada por proteínas do citoesqueleto, de ligação a actina,

proteínas da via glicolítica, moléculas de adesão e proteínas motoras de citoesqueleto contidas nas VEs. Além disso, esse estudo destaca possíveis candidatos a alvos em terapias seletivas para prevenir a resistência clínica.

Análises proteômicas diferenciais de exossomos secretados por células de câncer de próstata sensíveis e resistentes a drogas inibidoras de microtúbulos já foram reportadas. Nessas análises foi verificada uma maior abundância de proteínas ligadas a vias de sinalização de adesão, migração e invasão, destacando proteínas envolvidas com a ligação de citoesqueleto de actina e matriz extracelular nos exossomos oriundos das células resistentes a droga (Kawakami *et al.*, 2015). Além disso, proteínas associadas com remodelação de junções aderentes, atividades metabólicas, a ligação a ácidos nucleicos e degradação de matriz extracelular foram identificadas enriquecidas em exossomos secretados por células desse tipo de câncer com fenótipo quimiorresistente (Kharaziha *et al.*, 2015).

Lopes-Rodrigues *et al.* (2016) demonstraram que células de leucemia mielóide crônica e NSCLC (linhagem RH460) com fenótipo MDR secretam maior quantidade de VEs, as quais também apresentam diâmetro médio maior do que as VEs secretadas pelas células sensíveis. Para explicar melhor essas características, os autores realizaram a proteômica comparativa que resultou na hipótese de que as VEs das células resistentes apresentam biogênese diferente das VEs de células sensíveis a drogas, sugerindo, assim, a ocorrência de um empacotamento seletivo de proteínas nas vesículas.

Células de câncer de mama quando submetidas ao tratamento com a droga paclitaxel se tornam senescentes, o que resulta na habilidade dessas células em evadir o processo de apoptose e em liberar uma quantidade maior de VEs em comparação com células não-senescentes. A proteômica comparativa das VEs de células de câncer de

mama submetidas ou não ao tratamento com paclitaxel foi capaz de identificar proteínas-chave envolvidas na proliferação celular, depleção de ATP, apoptose e no fenótipo de secreção associado à senescência (Kavanagh *et al.*, 2017). Neste caso, os autores sugerem que as células senescentes induzidas por quimioterapia utilizam as VEs para a remoção dessas proteínas, com o intuito de manter em parte o perfil senescente.

Em um estudo com VEs da linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão PC9 resistente a droga gefitinibe, foram identificadas proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como adesão celular, endocitose, sinalização de insulina, fosforilação oxidativa, ribossomos e proteases. De modo geral, foram identificadas diversas proteínas oriundas da membrana plasmática ou de componentes associados à mesma (como retículo endoplasmático, Golgi, junções celulares e estruturas vesiculares) e do citoesqueleto (Choi *et al.*, 2014).

Conhecer a composição, em especial o perfil proteico, das VEs liberadas por células humanas de adenocarcinoma de pulmão sensíveis e resistentes a drogas, permite não somente compreender melhor os possíveis mecanismos envolvidos na transferência de resistência tumoral, mas também propor novos alvos de diagnósticos e terapêuticos para o câncer de pulmão (Choi *et al.*, 2012; Nawaz *et al.*, 2014; Klein-Scory *et al.*, 2014; Jakobsen *et al.*, 2015).

1.4 Justificativa

O câncer de pulmão é um problema de saúde pública, sendo um dos tipos de câncer mais frequentes entre os casos diagnosticados e a principal causa de mortes relacionadas ao câncer. A resistência a drogas durante o tratamento do câncer de pulmão é uma situação comum, o que limita o sucesso de cura. Múltiplos fatores moleculares podem estar envolvidos na resistência à CDDP, principal droga utilizada no tratamento

do câncer de pulmão. VEs podem desempenhar um papel importante na transferência de resistência a quimioterápicos no microambiente tumoral. Dessa forma, o estudo comparativo das proteínas contidas em VEs liberadas por células sensíveis e resistentes a drogas pode auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização da quimiorresistência em câncer de pulmão. A partir de estudos proteômicos de VEs pode-se ainda propor marcadores moleculares como alvos de diagnóstico, assim como alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos de combate à doença. Estudos proteômicos de VEs secretadas por diferentes células tumorais estão disponíveis na literatura, porém, até o momento, não foram publicados dados sobre o conteúdo proteico de vesículas liberadas por células A549 de adenocarcinoma de pulmão, embora o seu envolvimento com a resistência à CDDP já tenha sido relatado. Além disso, estudos proteômicos comparativos globais de VEs de células sensíveis e resistentes a drogas são escassos, inclusive não foram publicados dados nesse sentido referentes à quimiorresistência a CDDP, somente para outras drogas anticâncer.

1.5 Objetivo geral

Investigar os possíveis papéis de VEs e suas proteínas na transferência intercelular de resistência entre células humanas de adenocarcinoma de pulmão sensíveis e resistentes à CDDP.

1.5.1 Objetivos específicos

- Estabelecer uma sublinhagem celular com resistência adquirida à CDDP a partir de células A549 de adenocarcinoma de pulmão humano;
- Demonstrar a transferência e internalização de VEs entre as células A549 sensíveis e resistentes à CDDP;

- Demonstrar a transferência de resistência à CDDP das células A549 resistentes para as células A549 sensíveis a droga;
- Isolar e caracterizar as VEs liberadas pelas células A549;
- Avaliar a presença de marcadores proteicos de vesículas nas VEs isoladas das células A549;
- Definir e comparar o perfil proteico das VEs liberadas pelas células A549 sensíveis e resistentes à CDDP;
- Identificar proteínas de VEs possivelmente envolvidas com a transferência de resistência à CDDP em câncer de pulmão.

2. MATERIAIS & MÉTODOS

2.1 Linhagens celulares e indução de resistência à CDDP

As células parentais A549 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, a 37 °C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂. As células com resistência adquirida (RA-A549, de Resistência Adquirida-A549) foram estabelecidas pela exposição contínua da linhagem parental a concentrações crescentes de CDDP. Inicialmente, 3 x 10⁵ células foram cultivadas por 24 h para adesão celular; após esse período, a CDDP foi adicionada ao meio na concentração final de 0,1 µM e o cultivo foi mantido até a confluência de 80-90% (7 dias), quando então as células foram tripsinizadas. Esse procedimento foi repetido por mais 4 vezes com a mesma população celular, com um acréscimo de 0,1 µM da droga a cada subcultivo, resultando em uma faixa de exposição gradual da droga de 0,1 a 0,5 µM. A citotoxicidade à CDDP (IC₅₀) foi confirmada por ensaio de sulforodamina B (SRB),

como descrito por Becker *et al.* (2014). Após a confirmação da resistência adquirida pelas células RA-A549, as mesmas foram mantidas em cultivo com 0,5 μM de CDDP, com intuito de receber pressão citotóxica para tornar a resistência constante. Antes de qualquer experimento, as células foram cultivadas por 3 dias em meio livre da droga, para eliminar possíveis efeitos da mesma.

2.2 Ensaios de transferência e internalização de VEs pelas células A549

Células A549 sensíveis a CDDP (1×10^5) foram cultivadas em lamínulas contidas nos poços de uma placa de cultura de 24 poços com meio RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina por 24 h a 37°C em 5% de CO_2 para adesão celular (**Figura 6**). No segundo dia, células A549 sensíveis ou resistentes a CDDP ($1,2 \times 10^5$), marcadas com o fluoróforo *CellTracker* CM-DiI (Life Technologies) conforme instruções do fabricante, foram semeadas em inserto *transwell* (poro de 1 μM) e o cocultivo foi mantido em meio de cultura completo contendo 10% de SFB livre de exossomos (System Bioscience), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina por 24 h a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Ao término do cocultivo, as lamínulas foram retiradas da placa de cultura e as células aderidas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 1 min e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min a temperatura ambiente. As células fixadas foram incubadas com 0,1 μM de DAPI por 20 min a temperatura ambiente para marcação nuclear. As células foram visualizadas no microscópio confocal espectral FV 1000 do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. Como controles negativos, foram realizados cocultivos com as duas linhagens sem a marcação com CM-DiI, apenas com a marcação dos núcleos (DAPI).

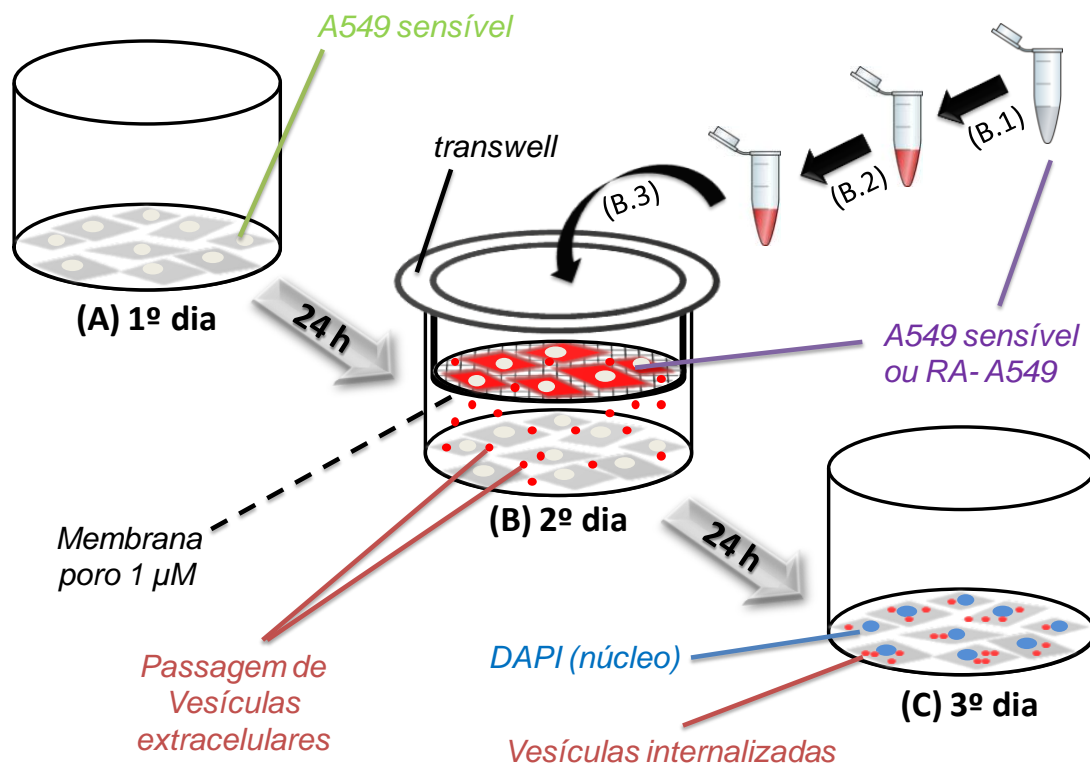


Figura 6. Desenho esquemático do ensaio de transferência e internalização de VEs pelas células A549. (A) No primeiro dia, células sensíveis a CDDP foram cultivadas por 24 h sobre lamínulas em placas de 24 poços. (B) No segundo dia, células sensíveis ou resistentes (RA-A549) a CDDP foram marcadas com o corante fluorescente *CellTracker* CM-DiI (cor vermelha) (B.1), lavadas com PBS 1X pH 7,4 (B.2) e semeadas em inserto *transwell* (B.3) para cocultivo com as células A549 sensíveis por 24 h. (C) No terceiro dia, as células A549 aderidas na lamínula foram coradas com DAPI para marcação do núcleo e a fluorescência foi analisada por microscopia confocal.

2.3 Cocultivo de células A549 e análise da transferência de quimiorresistência

Inicialmente, 2×10^4 células A549 sensíveis à CDDP foram cultivadas sobre lamínulas em placas de cultura de 24 poços em meio RPMI 1640 (Life Technologies) contendo 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina por 24 h a 37°C em 5% de CO₂ (Figura 7). Após o período de adesão, foram adicionados insertos *transwell* (poros de 1,0 µm) contendo 1×10^4 células A549 sensíveis ou resistentes à CDDP e os cocultivos foram mantidos em meio de cultura completo contendo 10% de SFB livre de exossomos (Life Technologies). Foram realizadas duas condições de cocultivo: a) condição R/S – cocultivo entre linhagem resistente (inserto) e sensível

(poço); b) condição S/S – cocultivo contendo linhagem sensível no inserto e no poço. Após 24 h de cocultivo inicial, as células foram mantidas em ausência (grupo controle) ou presença (grupo experimental) de CDDP (2 μ M) por 72 h a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao término do tratamento, as células aderidas nas lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1X pH 7,4 e, em seguida, incubadas por 5 min a temperatura ambiente com o fluoróforo FDA (diacetato de fluoresceína, Sigma), de cor verde, que marca células vivas. Após a marcação, as células foram novamente lavadas com PBS e imediatamente visualizadas no microscópio de fluorescência Axioskop 40 (Carl Zeiss) do Centro de Biotecnologia da UFRGS. As imagens das células foram obtidas de 8 campos diferentes em cada lamínula e a contagem celular foi realizada utilizando o programa ImageJ. Ao todo, foram realizadas duas condições de cocultivo com dois diferentes tratamentos, totalizando 4 grupos de estudo. O experimento foi realizado em triplicata para cada grupo estudado e repetido em três datas diferentes.

2.4 Análise estatística dos dados de cocultivo

Os dados de contagem de células vivas no ensaio de transferência de resistência intercelular sob cocultivo foram analisados usando equações de estimação generalizadas (*Generalized Estimating Equations* – GEE) para um modelo para dados repetidos (poços), considerando distribuição de Poisson para os dados e função de ligação logarítmica. Foram avaliados os efeitos do tratamento com CDDP (controle ou experimental), da condição de cocultivo (R/S ou S/S) e da data do experimento sobre as contagens de células vivas. A interação tripla entre estes três fatores e todas as interações entre os fatores tomados dois a dois foram também analisadas no modelo inicial. Após a retirada das interações não significantes estatisticamente, o modelo comportou os efeitos principais dos três fatores (tratamento, condição e data) e as interações tratamento x data e grupo x condição.

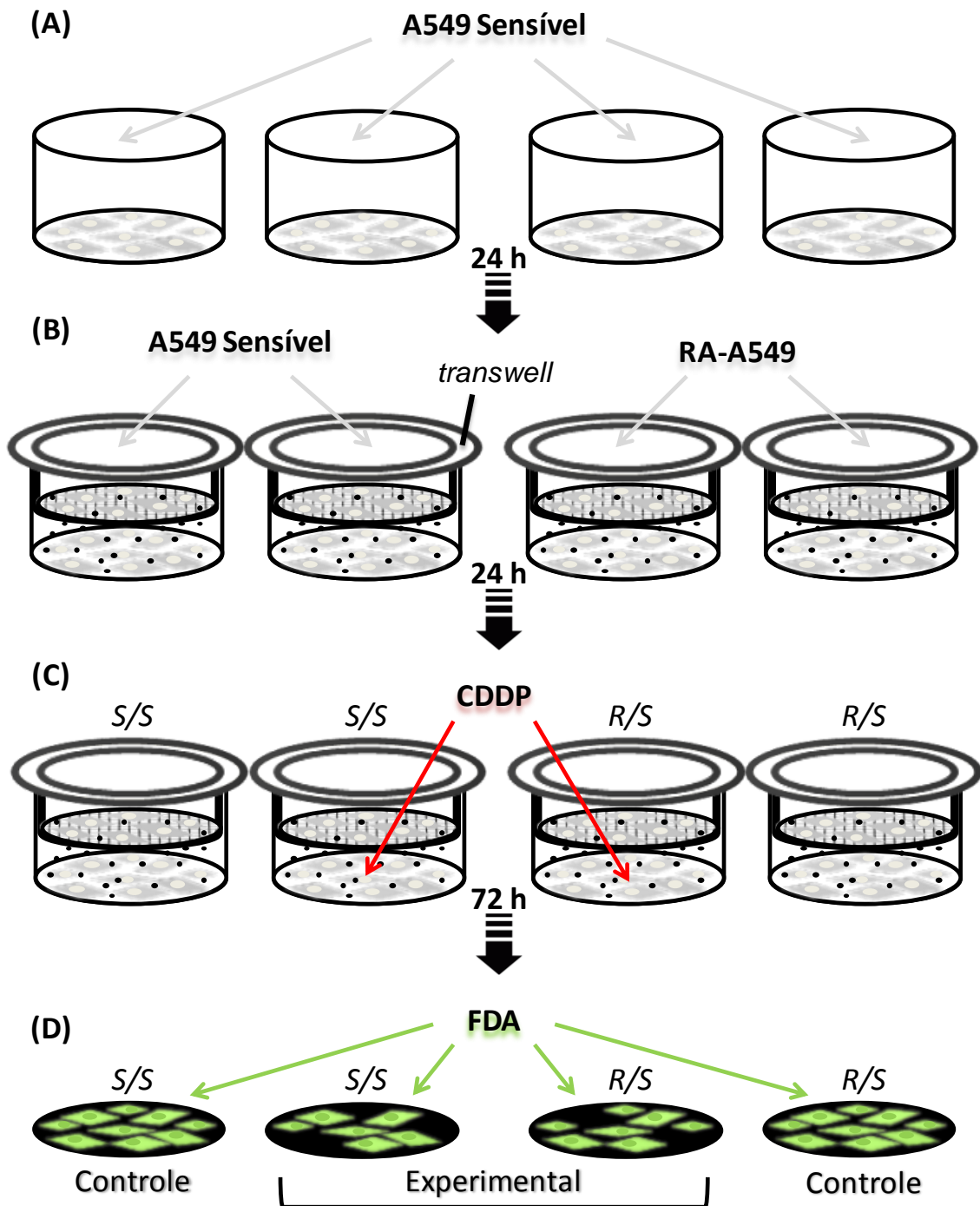


Figura 7: Desenho esquemático do ensaio de cocultivo para avaliação de transferência de resistência a CDDP entre células A549 sensíveis e resistentes (RA-A549) a droga. (A) Células A549 sensíveis à droga foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços por 24 h. (B) Introdução dos inserts *transwell* contendo células sensíveis (cocultivo S/S) ou resistentes (cocultivo R/S) e cocultivo por 24 h. (C) Cocultivo em presença (grupo experimental) ou ausência (grupo controle) de CDDP (2 μ M) por 72 h. (D) Marcação das células vivas com fluoróforo FDA (cor verde).

Na comparação entre as médias, foi usada a correção de Bonferroni para múltiplos-testes. Um valor-*p* de 0,05 foi considerado como limite para a significância estatística. O programa utilizado para as análises foi o SPSS v. 18.

2.5 Isolamento de VEs secretadas por células A549

As células sensíveis e resistentes a CDDP foram cultivadas até a confluência de 80-90%, lavadas com PBS 1X pH 7,4 por duas vezes e, em seguida, cultivadas por 48 h em meio RPMI 1640 (Life Technologies) na ausência de SFB, acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂. As VEs foram isoladas a partir do sobrenadante de cultivo pelo método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação (Beckman, rotor 50.2 Ti), conforme Théry *et al.* (2006), com acréscimo de uma etapa de filtração com membrana 0,22 µM antes da ultracentrifugação. Na etapa final o precipitado de vesículas foi ressuscitado com PBS 1X pH 7,4 e, após, as vesículas foram mantidas conservadas em gelo a 4°C ou congeladas a -20°C até o seu uso específico. As vesículas foram quantificadas indiretamente pela quantidade de proteínas de superfície de membrana pelo ensaio de MicroBCA (Pierce) ou por fluorimetria pelo uso do Qubit (Invitrogen™).

2.6 Caracterização das VEs liberadas *in vitro* pelas células A549

2.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As VEs isoladas segundo descrito no item 2.5 foram fixadas em paraformaldeído 2% por 3 min e depositadas em um *grid* de Formvar/Carbono (Electron Microscopy Sciences) por 20 min. Após lavagens com água Mili-Q, as vesículas foram fixadas com 2,5% glutaraldeído por 5 min, lavadas novamente e, em seguida, incubadas com 2% acetato de uranila por 5 min para o contraste. As vesículas foram observadas em

microscópio eletrônico de transmissão JEM-1200 EX-II (JEOL) (tensão de 100 kV) do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS.

2.6.2 Citometria de fluxo

As VEs (cerca de 20 μ g de proteína) foram incubadas com esferas magnéticas conjugadas a anticorpos anti-CD63 (*Exosome-Human CD63 Isolation/Detection reagent*, InvitrogenTM). Após, as esferas foram incubadas com anticorpo anti-CD63 marcado com FITC (BD Biosciences), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences).

2.6.3 Nanoparticle tracking analyses (NTAs)

As NTAs foram realizadas no equipamento ZetaView® (Particle Metrix, Germany), a temperatura ambiente, utilizando amostras diluídas em PBS 1X pH 7,4. O equipamento foi equipado com uma célula embutida e um microscópio de difração a laser, no qual uma câmera de vídeo foi acoplada. Um vídeo do movimento Browniano das partículas foi capturado a cada 10 s e o programa realizou o monitoramento das partículas individualmente, sendo que as medidas foram registradas e analisadas em 11 posições diferentes. O diâmetro hidrodinâmico das vesículas foi calculado utilizando equação de Stokes-Einstein e as imagens de vídeo das partículas dispersas foram acompanhadas em tempo real usando uma câmera CCD. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Mineral e Ambiental, do Departamento de Engenharia de Minas da UFRGS.

2.6.4 Western blot anti-CD63

As amostras proteicas foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12% por 1 h com voltagem constante de 200V. Em

seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond™ECL™, Amersham) em sistema semi-seco com tampão contendo 20 mM Tris, 150 mM glicina e 20% metanol, por 1 h a 15V, e a transferência foi verificada por coloração com Ponceau S 1X. A membrana foi bloqueada com 5% blotto-Tween (5% leite em pó desnatado diluído em 0,1% PBS-Tween) por 24h a 4°C. Após, a membrana foi lavada 5 vezes com 0,1% PBS-Tween e incubada com o anticorpo anti-CD63 (Life Technologies) na diluição 1:750 por 24 h a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 5 vezes com 0,1% PBS-Tween e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma, diluição 1:5000), por 1 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 5 vezes com 0,1% PBS-Tween e a revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada utilizando o reagente de detecção Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). A detecção da quimiluminescência foi visualizada no sistema de imagem Molecular Imager® Versadoc™ (Bio-Rad).

2.7 Preparação de amostras para espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As VEs isoladas a partir de três cultivos celulares independentes de cada linhagem celular estudada foram reunidas em dois *pools* amostrais (A549 parental sensível e RA-A549) com o intuito de aumentar a possibilidade de detecção de um número maior de peptídeos. As vesículas foram diluídas em 25 mM bicarbonato de amônio contendo 0,5% RapiGest w/v (Waters) e, em seguida, aquecidas a 100 °C por 5 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente e tratadas com 5 mM DTT a 60 °C por 30 min e 15 mM iodoacetamida por 30 min a temperatura ambiente para redução e alquilação das proteínas, respectivamente. As proteínas foram então digeridas com tripsina (*Tripsina Mass Spectrometry Grade*, Promega) na proporção de 1:20 (µg enzima: µg proteína) por 16-18 h a 37°C. O RapiGest foi

hidrolisado por adição de ácido trifluoroacético na concentração final de 0,5% e incubação a 37 °C por 45 min. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante contendo os peptídeos foi dessalinizado utilizando cartucho HLB Oasis (Waters), condicionando a coluna com 2 mL de acetonitrila e 2 mL de 0,1% ácido trifluoroacético (TFA). As amostras foram aplicadas na coluna, lavadas com 2 mL de 0,1% TFA e os peptídeos foram eluídos com uma solução de 50% acetonitrila e 0,1% TFA. Por fim, as amostras foram congeladas e liofilizadas.

2.8 Análise dos peptídeos por LC-MS/MS

Os peptídeos gerados foram analisados por cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS, do inglês, *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*) utilizando um sistema UPLC nanoACQUITY acoplado ao espectrômetro de massas Xevo G2-XS Q-Tof (Waters) da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Os peptídeos foram separados por cromatografia analítica (Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µM, 2,1 x 50 mm, Waters) com fluxo de 8 µL/min, utilizando um gradiente linear de 7-85% água/0,1% ácido fórmico ao longo de 90 min. A análise de MS foi ajustada para 0,5 s e os dados registrados de 50 a 2000 m/z. As varreduras de MS/MS foram adquiridas de 50 a 2000 m/z e o tempo de varredura foi ajustado para 1 s. Os dados foram coletados em modo de aquisição independente de dados MS^E. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica a partir de cada *pool* amostral.

2.9 Análises de bioinformática

Os dados foram processados e a identificação de proteínas foi realizada através de buscas em bancos de dados públicos de sequências de proteínas de *Homo sapiens* e *Bos taurus* (UniProt/Swiss-Prot) utilizando o software ProteinLynx Global Server

versão 2.5 (PLGS, Waters Corporation). Os parâmetros de busca incluem tolerância automática (tipicamente 10 ppm para íons precursores e 20 ppm para íons fragmento), tripsina como enzima, máximo de uma clivagem perdida, carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa e oxidação das metioninas como modificação variável. Os resultados das buscas foram exportados para o programa Scaffold (*Proteome Software Inc*, versão 4.8.3) para validação e análise comparativa das identificações de proteínas e peptídeos. As identificações dos peptídeos foram aceitas quando estabelecida uma probabilidade maior de 95% e a identificação das proteínas foram aceitas quando presente o mínimo de dois peptídeos por proteína e estabelecida uma probabilidade maior de 99%. Uma busca contra um banco de dados randomizado (decoy) foi utilizada para estimar a taxa de falsos positivos (FDR, *false discovery rate*), resultando em 1,6% para proteínas e 0,14% para peptídeos. Proteínas/peptídeos identificados em ambas as espécies foram analisados manualmente para validação. As proteínas foram consideradas de origem bovina apenas quando continham um número maior de peptídeos identificados na proteína de bovinos em comparação com a proteína humana e especificidade de aminoácidos com relação às sequências proteicas bovinas. A quantificação relativa das proteínas nas diferentes amostras foi realizada através de método *label free*, baseado em valores de *Top 3 Precursor Intensity*. Diferenças na abundância de proteínas entre as amostras foram avaliadas estatisticamente por teste t de Student utilizando o programa Perseus (MaxQuant, versão 1.5.1.6). Um valor-*p* de 0,05 foi considerado como limite para a significância estatística e a razão entre as médias dos valores de expressão das proteínas diferencialmente abundantes foi convertida em valor de log₂ para análise de *fold change* da expressão proteica. As proteínas diferencialmente expressas entre os fenótipos celulares foram classificadas funcionalmente através dos termos de *Gene Ontology* (GO), utilizando o programa

Cytoscape e o *plugin* ClueGO (Maere *et al.*, 2005). Para a análise funcional foram utilizados como parâmetros: teste hipergeométrico de dois lados (*Enrichment/Depletion*) com correção de Benjamini-Hochberg; nível mínimo e máximo de GO, respectivamente de 3 e 8; número mínimo de genes escolhidos foi de 2 e a porcentagem mínima de genes de 4%; porcentagem de 68% para um cluster ser significativo; porcentagem de compartilhamento de grupo de 50%; e valor de Kappa ajustado para 0,56. Além disso, as proteínas identificadas foram comparadas com os dados depositados nos bancos de dados públicos de VEs, Vesiclepedia e Exocarta, por meio de linha de comando no Linux, com uso de código tipo awk ‘NR==FNR{a[\$0];next} \$4 in a’ file1.csv file2.csv.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Linhagens celulares e indução de resistência à CDDP

As células resistentes a CDDP estabelecidas a partir da linhagem parental A549 pelo tratamento com concentrações crescentes da droga (0,1 a 0,5 μM), denominadas RA-A549 (de Resistência Adquirida-A549) apresentaram uma morfologia diferente da linhagem parental sensível. As células RA-A549 apresentaram formato e tamanho irregulares, com um aspecto fusiforme, assemelhando-se a fibroblastos, com protruções celulares visíveis (**Figura 8**).

Esse fenótipo, já descrito em células A549 com resistência adquirida a CDDP por Yu *et al.*, 2014, é característico da “transição epitelial-mesenquimal” (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*), processo observado com frequência em células tumorais resistentes a diferentes quimioterápicos (Hiscox *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Kajiyama *et al.*, 2007; Rho *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Rosanò *et al.*, 2011). Estudos demonstram que o processo EMT está associado a uma menor expressão

de proteínas de junções celulares epiteliais, tais como E-caderina e conexina43, e a um aumento de expressão de marcadores mesenquimais (como vimentina, Snail e Slug) e da capacidade de invasão e migração das células. Sendo assim, EMT contribui com o sucesso no desenvolvimento e dispersão das células cancerígenas.

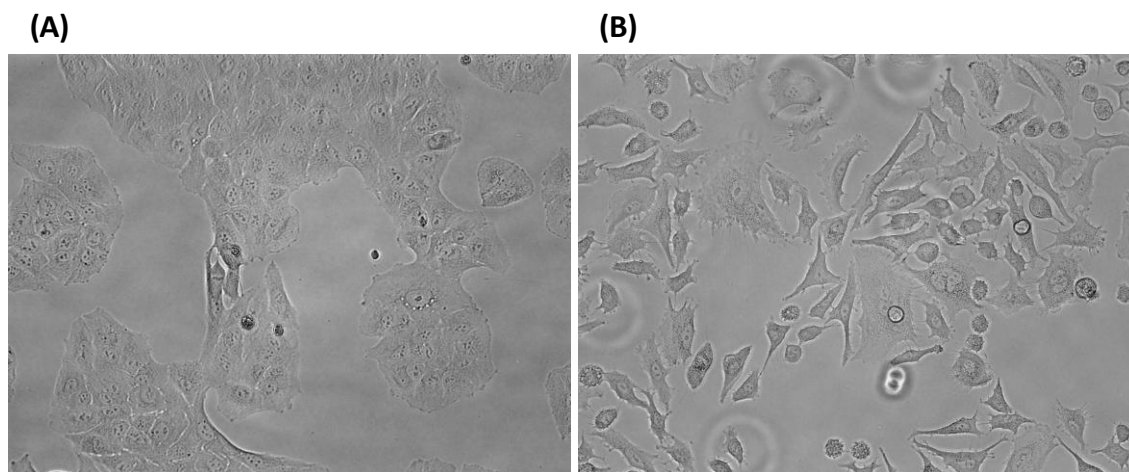


Figura 8. Microscopia de luz mostrando as células A549 sensíveis (A) e resistentes (B) a CDDP. Magnificação, 460x.

A citotoxicidade à CDDP (IC_{50}) de cada linhagem celular foi confirmada por ensaio de SRB, no qual a sublinhagem resistente a droga apresentou um valor de IC_{50} cerca de 4,5 vezes maior ($13,5 \mu M$) do que aquele da linhagem parental ($2,9 \mu M$) (**Figura 9**).

Segundo as revisões de Siddik (2002, 2003), a resistência clínica à CDDP é definida pela falha na apoptose das células tumorais sob tratamento químico com concentrações plasmáticas da droga acessíveis ou relevantes clinicamente, o que dificulta a definição do nível exato de resistência tumoral a CDDP em pacientes. Entretanto, o autor concluiu que tumores podem apresentar níveis pelo menos duas vezes mais elevados de resistência após o tratamento clínico com CDDP, pois tumores refratários respondem melhor aos efeitos da droga quando são submetidos a uma dose clínica padrão duplicada. Em um estudo clínico, foi observado um aumento de pelo

menos 4 vezes nos níveis de resistência adquirida no uso de carboplatina, um quimioterápico análogo a CDDP (Jodrell *et al.*, 1992). Mcdermott *et al.* (2014) listou linhagens tumorais estabelecidas a partir de pacientes antes e depois do tratamento quimioterápico com diferentes drogas, de modo que a maioria mostrou um aumento no nível de resistência da ordem de 2-5 vezes com base na comparação de valores de IC₅₀. Dentre estas, cabe destacar duas linhagens tumorais de pacientes com câncer de pulmão submetidos à quimioterapia combinada com diferentes compostos, incluindo CDDP, que apresentaram um aumento de resistência da ordem de 2,3 ou 8,3 vezes (Hida *et al.*, 1989; Kawai *et al.*, 2002). Logo, os níveis de resistência a CDDP apresentados pela linhagem resistente RA-A549 estabelecida em nosso estudo estão de acordo com aqueles observados em estudos de resistência clínica, garantindo que nosso modelo é relevante clinicamente para estudar os mecanismos de resistência das células tumorais a droga CDDP.

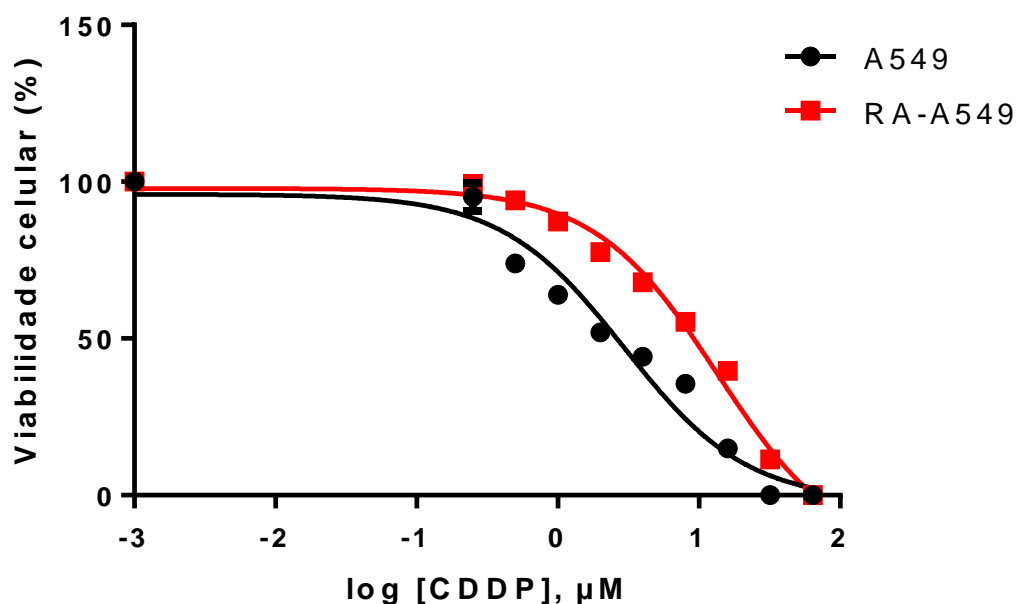


Figura 9. Curvas de citotoxicidade da linhagem sensível (A549) e da sublinhagem resistente (RA-A549) sob tratamento com CDDP.

Devido aos aspectos citados, ou seja, por apresentar uma suposta EMT, que está associada à quimiorresistência, como indicado em outros estudos, e por exibir um valor de IC₅₀ superior às células parentais e em níveis clinicamente relevantes, a sublinhagem RA-A549 se apresenta como um modelo celular interessante e valioso para estudar *in vitro* as características moleculares envolvidas na aquisição de resistência a quimioterapia com CDDP pelos tumores de adenocarcinoma de pulmão.

3.2 Internalização de VEs e transferência de resistência entre células A549

Com intuito de verificar a possibilidade de transferência e internalização de VEs entre células A549, nós realizamos cocultivos entre células sensíveis e resistentes a CDDP, utilizando insertos *transwell* com membrana de poros de 1,0 µM. As células semeadas nos insertos foram previamente marcadas com o corante fluorescente de membranas CM-Dil (vermelho), permitindo que a transferência de VEs e a internalização das mesmas pelas células do poço fosse monitorada por microscopia confocal (**Figura 6**). A transferência e internalização de vesículas ocorreram tanto nos cocultivos S/S, como nos R/S, como pode ser observado nas imagens de microscopia de fluorescência (**Figura 10**).

Algumas características do fluoróforo CM-DiI corroboram com a especificidade do nosso experimento de transferência e internalização de VEs. O CM-DiI é internalizado nas células, com posterior reação intracelular que o transforma em um produto impermeável a membrana. Assim, conforme ocorre a formação da vesícula, o fluoróforo pode então ser englobado pelo compartimento que originará as vesículas ou já encontrar-se ligado às membranas que formarão tais estruturas celulares. Dessa forma, as vesículas transportarão a marcação quando forem liberadas pelas células, podendo ou não se fusionarem a membrana de uma célula distante.

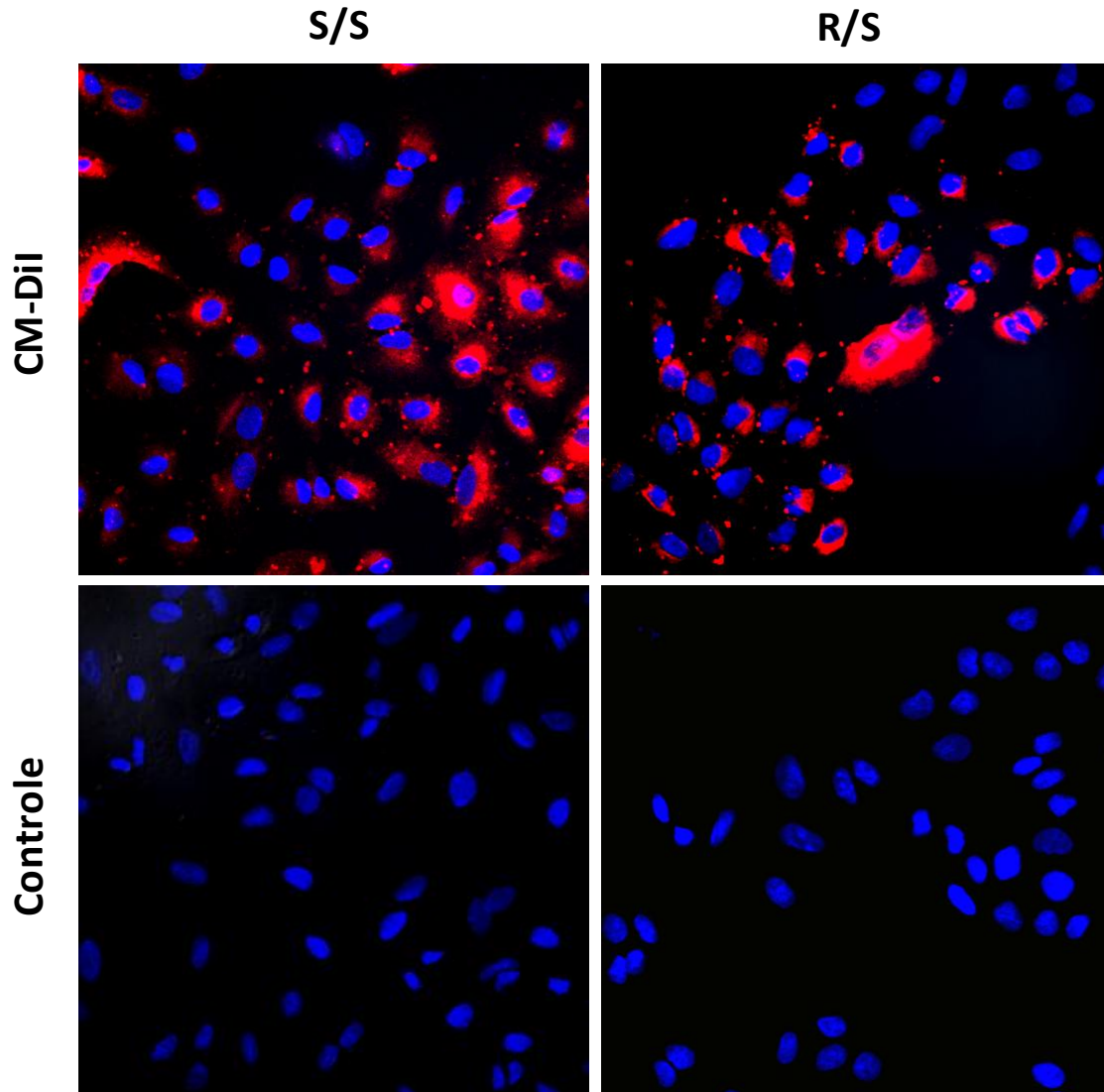


Figura 10. Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de internalização de VEs por células A549 sensíveis e resistentes a CDDP. Células sensíveis (A549) e resistentes (RA-A549) a CDDP foram marcadas com o corante fluorescente CM-Dil (vermelho) e semeadas em insertos *transwell* (poro de 1 μ M) para cocultivo com células A549. A transferência e internalização das vesículas nos cocultivos A549/A549 (S/S) e RA-A549/A549 (R/S) foi verificada por imagens de secções ópticas medianas de *z-stacks* obtidas por microscopia confocal. Os controles negativos (controle) correspondem aos mesmos cocultivos realizados sem marcação com CM-Dil. Em todos os ensaios, o núcleo das células foi marcado com DAPI (azul).

Para garantir a remoção de resíduos de fluoróforo que não foi retido na célula durante a marcação, foram realizadas várias lavagens com solução salina (PBS), descartando a possibilidade de passagem do CM-Dil pela membrana do inserto *transwell*. Entretanto, é preciso destacar que se ocorresse a passagem de fluoróforo pelo

transwell, sem o transporte vesicular, seria esperado ver a marcação na membrana da célula receptora.

Como podemos ver nas imagens de microscopia, a marcação em vermelho das células do poço está presente no citoplasma e próximo ao núcleo, sendo, na maioria das células, visualizada como pontos vermelhos. Com base nessas observações, podemos afirmar que foi possível demonstrar de forma específica a transferência e internalização de VEs a partir do cocultivo *in vitro* entre células A549 sensíveis e resistentes a CDDP, as quais podem, provavelmente, trocar informações moleculares por meio desse mecanismo.

Xiao *et al.* (2014) já haviam demonstrado a possibilidade de internalização de exossomos pelas células A549. Entretanto, não foram publicados trabalhos mostrando que células A549 sensíveis podem internalizar VEs secretadas por sublinhagem A549 resistente a CDDP, o que enfatiza o papel dessas estruturas secretoras na transferência de moléculas ligadas a quimiorresistência em adenocarcinoma de pulmão. Além disso, a maioria dos trabalhos estuda a internalização de vesículas pela incubação direta de VEs e células, sendo difícil determinar se a quantidade de VEs adicionada no cultivo celular estaria próxima a uma situação biológica. Esse aspecto é particularmente importante quando estudado o efeito das VEs sobre as células, como em experimentos de transferência de quimiorresistência. Dessa forma, a escolha pelo cocultivo celular buscou melhor simular as condições de comunicação celular, de modo que as interações biológicas pudessem ocorrer de forma mais natural e ampla. É importante enfatizar tal fato, pois em um microambiente tumoral existe uma heterogeneidade de perfis celulares (Tellez-gabriel *et al.*, 2016), com células resistentes interagindo com sensíveis e vice-versa. Logo, a escolha do mecanismo de interação intercelular vai depender da própria célula, não sendo algo tendencioso, mas dinâmico.

Cocultivos celulares foram realizados a fim de analisar a possibilidade de transferência de resistência à CDDP das células RA-A549 para as células A549 sensíveis à droga. Os cocultivos foram realizados na presença e ausência da droga, verificando ao final dos ensaios o número de células vivas por coloração com corante fluorescente.

Conforme podemos notar na **Figura 11**, as células do grupo experimental (tratado com CDDP) apresentaram morfologia alterada, conforme discutido no tópico anterior, assim como menor número no campo de observação, fato esperado devido à ação da CDDP nas células. Além disso, as células tratadas apresentaram um aumento de tamanho, em comparação às células do grupo-controle. Essas alterações na morfologia e número das células tratadas com CDDP foram observadas em ambos os ensaios, isto é, tanto no cocultivo S/S, quanto no cocultivo R/S, indicando que a CDDP teve efeito, independentemente da interação celular envolvida.

Por outro lado, verificamos uma diferença significativa ($p < 0,001$) no número de células que sobreviveram ao tratamento com CDDP entre as condições S/S e R/S, sendo observado um número médio maior de células contadas na condição R/S (**Figura 12**). Esse resultado indica que as células A549 cocultivadas com a linhagem resistente a CDDP apresentam uma menor sensibilidade a droga, o que sugere uma possível transferência de quimiorresistência entre as células. No grupo-controle não houve diferença entre as condições S/S e R/S ($p = 0,568$).

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as médias de células contadas nos grupos tratado e controle, demonstrando que o tratamento foi efetivo. Essa diferença não foi de igual tamanho nas três datas dos ensaios, de modo que a maior diferença foi na terceira data, seguida pela primeira data e, por último, a

segunda data. Nos dados dos controles, todas as três médias diferiram entre as datas ($p < 0,001$), enquanto no grupo experimental não houve diferença ($p = 1000$).

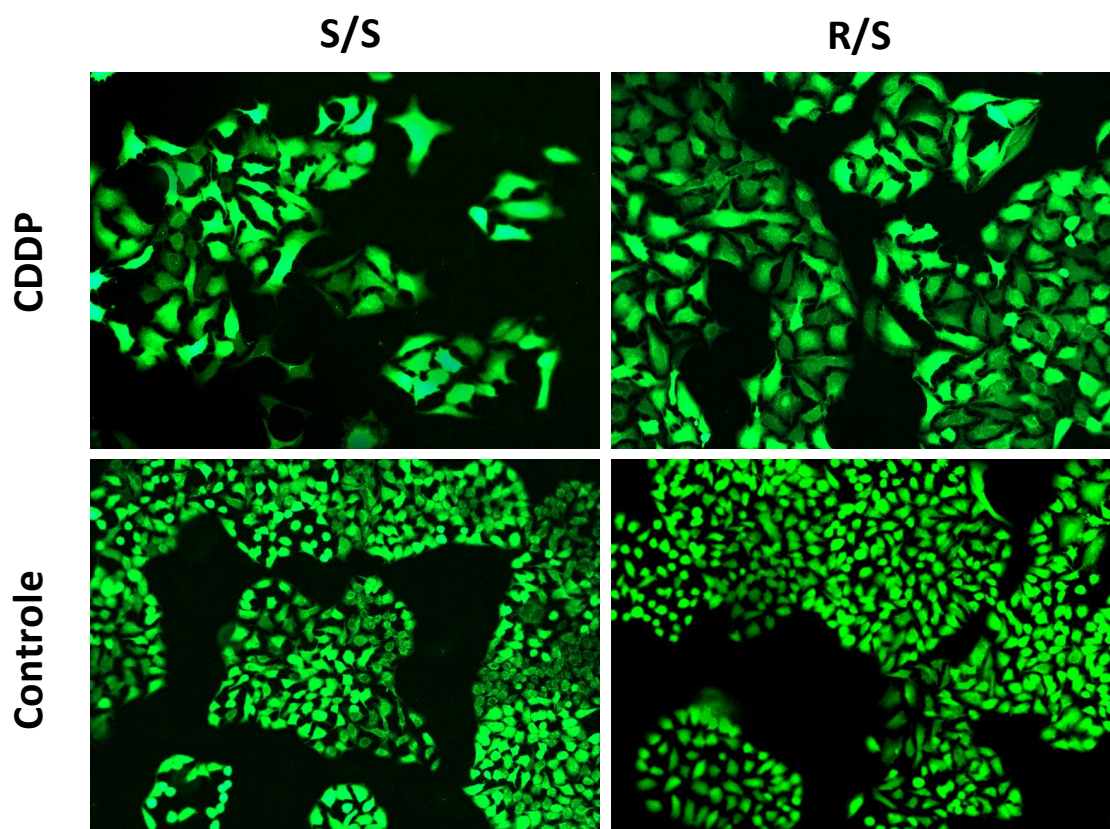


Figura 11. Microscopia de fluorescência das células A549 submetidas a ensaios de cocultivo para verificação de transferência de resistência a CDDP. Células A549 foram submetidas a cocultivo com células sensíveis (A549, S/S) ou resistentes (RA-A549, R/S) a CDDP. Os cocultivos S/S e R/S foram mantidos por 72 h na ausência (grupo controle) ou presença (grupo CDDP) de CDDP e as células foram coradas com o fluoróforo FDA. Magnificação, 100x.

Embora o nosso ensaio não seja capaz de abranger a interação celular tumoral global, a qual envolve diferentes células do câncer estudado e do estroma tumoral, o mesmo foi capaz de demonstrar que é possível a transferência de resistência, mesmo que as células em questão estejam distantes uma da outra. A transferência de quimiorresistência pode ter ocorrido por meio de diferentes mecanismos e moléculas envolvidas na comunicação extracelular. Análises mostram que o secretoma tumoral induzido por quimioterapia, representado por moléculas secretadas diferencialmente em resposta a droga, pode se difundir pelo microambiente tumoral, atuando na modulação

da sobrevivência de células tumorais sensíveis a drogas, assim como nos processos de expansão e disseminação de clones resistentes a quimioterápicos (Obenauf *et al.*, 2015). Embora não possamos descartar a participação de outros fatores transientes no meio intercelular, tais como moléculas solúveis liberadas diretamente no meio ou transportadas por nanotubos (Thayanithy *et al.*, 2017), as evidências apresentadas pela literatura e pelos experimentos de cocultivo realizados neste trabalho, apontam um papel importante das VEs na transferência de resistência a CDDP entre células A549.

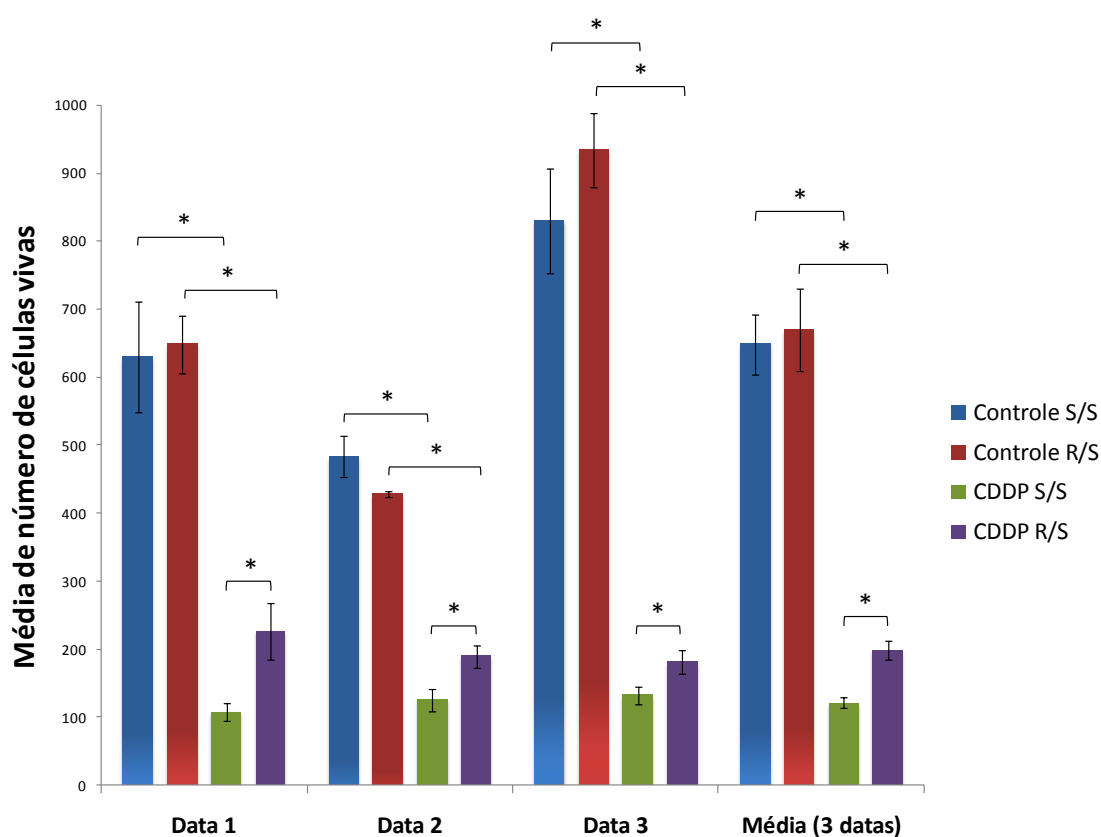


Figura 12. Média do número de células contadas nos ensaios de cocultivo celular por triplicata biológica em cada grupo (Controle = células cultivadas em meio livre de droga ou CDDP = células tratadas com 2 μ M de CDDP por 72 h) x condição (S/S ou R/S), em três datas experimentais diferentes. A média mostrada no gráfico (último conjunto de colunas) se refere à média dos dados das três datas. * $p < 0,001$.

de Souza *et al.* (2015) demonstraram que células A549 em cocultivo com uma linhagem de leucemia mieloide crônica com fenótipo MDR acumulam gp-P, inibidores de proteínas de apoptose (survinina, c-IAP1 e XIAP) e miRNAs. O mesmo ocorre

quando as células são incubadas com microvesículas das células MDR, indicando, assim, que essas estruturas membranosas podem ter atuado na transferência intercelular das moléculas estudadas. Além disso, os autores verificaram que células A549 tratadas com CDDP por 24 h, após o cocultivo, apresentam menor taxa de morte celular, sugerindo que a transferência de moléculas de uma linhagem MDR-positiva por meio de microvesículas pode induzir a transformação de uma linhagem A549 sensível em resistente a CDDP.

Em linhagens de leucemia e de câncer de mama foi evidenciado que VEs podem funcionar como vetores para aquisição de resistência em células sensíveis a drogas, sendo possível a transferência de gp-P através dessas vesículas (Bebawy *et al.*, 2009; Pasquier *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015). Em um estudo com linhagens celulares de câncer de mama, Jaiswal *et al.* (2013) demonstraram a transferência de resistência por meio de VEs *in vivo*, a qual pode ocorrer mesmo na ausência de pressão seletiva. Nesse estudo, também foi observada a transferência da gp-P entre linhagens celulares diferentes por meio de VEs. Essa transferência é um processo seletivo dependente da composição molecular da vesícula, sugerindo que moléculas de superfície e proteínas de domínio FERM podem estar envolvidas na seletividade. Ma *et al.* (2014) em estudo com linhagem celular de câncer de mama encontrou que vesículas circulantes contendo TrpC5, uma proteína receptora que é reguladora de gp-P, são capazes de transformar células sensíveis em resistentes a droga adriamicina. No mesmo trabalho, foi mostrado que TrpC5 é requerido para a formação das vesículas e internalização do quimioterápico. Tais fatos demonstram o quanto a comunicação entre as células pode ocorrer e ser facilitada pela ação de VEs, conseqüentemente favorecendo a disseminação de resistência tumoral e, concomitantemente, dificultando a ação dos quimioterápicos. Apesar das evidências de

transferência de proteínas por meio de VEs com consequências na sensibilidade celular a drogas em diferentes linhagens tumorais, dados sobre proteínas vesiculares de células A549 ou outras linhagens celulares de NSCLC ainda são escassos.

Por outro lado, o papel de miRNAs oriundos de VEs na regulação de mecanismos de resistência a CDDP em células de NSCLC já foi demonstrado. A549 é a linhagem celular mais utilizada nos estudos e muitos dos miRNAs identificados nas VEs secretadas por essa linhagem estão correlacionados com vias de sinalização de quimiorresistência a droga CDDP (Fadejeva *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2017a, 2017b). Conforme Xiao *et al.* (2014), células A549 quando submetidas ao tratamento com CDDP são capazes de se comunicar com outras células por meio de exossomos e influenciar no aumento de resistência das mesmas. Os autores indicam que a resistência pode ser mediada por miRNAs e mRNAs, devido às diferenças no nível de expressão dessas moléculas entre células sensíveis e resistentes a droga. Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa demonstrou que células A549 sensíveis incubadas com exossomos da linhagem A549 resistente a CDDP apresentam aumento de IC₅₀ e redução nas taxas de apoptose, indicando transferência de resistência por meio dessas VEs (Qin *et al.*, 2017b).

No conjunto, essas informações indicam que as VEs desempenham um papel importante no processo de transferência/aquisição de quimiorresistência pelas células humanas A549 de adenocarcinoma de pulmão. As funções de miRNAs exossomais nesse processo estão melhor descritas, porém os dados disponíveis acerca do papel funcional das proteínas presentes nas VEs secretadas por essas células ainda são limitados e merecem uma análise mais ampla.

3.3 Isolamento e caracterização das VEs de células A549 e RA-A549

As VEs liberadas no meio pelas células A549 e RA-A549 foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação (**Figura 13A**). Diferentes técnicas foram utilizadas para caracterizar a população de VEs isoladas a partir do cultivo de células A549 sensíveis e resistente a CDDP (**Figura 13B-E**). Resultados semelhantes foram obtidos na análise das VEs isoladas de células A549 e RA-A549. Dessa forma, os dados apresentados na **Figura 13** são representativos da caracterização das VEs isoladas das células A549 sensíveis e resistentes a CDDP.

As VEs foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão, exibindo um formato arredondado e de tamanho variável (**Figura 13B**). A população de vesículas isoladas se mostrou heterogênea em tamanho, sendo possível visualizar vesículas com diâmetro de menos de 50 nm e até maiores de 200 nm, com predominância de uma população com diâmetro de ~100 nm. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por NTA, análise na qual foi detectada a presença de partículas com diâmetro entre 10 a 420 nm, com maior quantidade de vesículas de diâmetro de 105 nm (**Figura 13C**). Essas informações indicam que as vesículas isoladas dos cultivos de células A549 sensíveis e resistentes a CDDP são do tipo *exosome-like*, embora microvesículas (diâmetro acima de 100 nm) também estejam presentes.

Para confirmar a presença de VEs do tipo *exosome-like* na população de vesículas isoladas a partir do cultivo de células A549 sensíveis e resistentes a CDDP, foram realizados dois experimentos independentes utilizando o princípio de detecção da proteína CD63, um marcador específico de superfície de exossomos. As análises de citometria de fluxo demonstraram a ligação das VEs a anticorpos anti-CD63 conjugados a esferas magnéticas, conforme observado no histograma da **Figura 13D**.

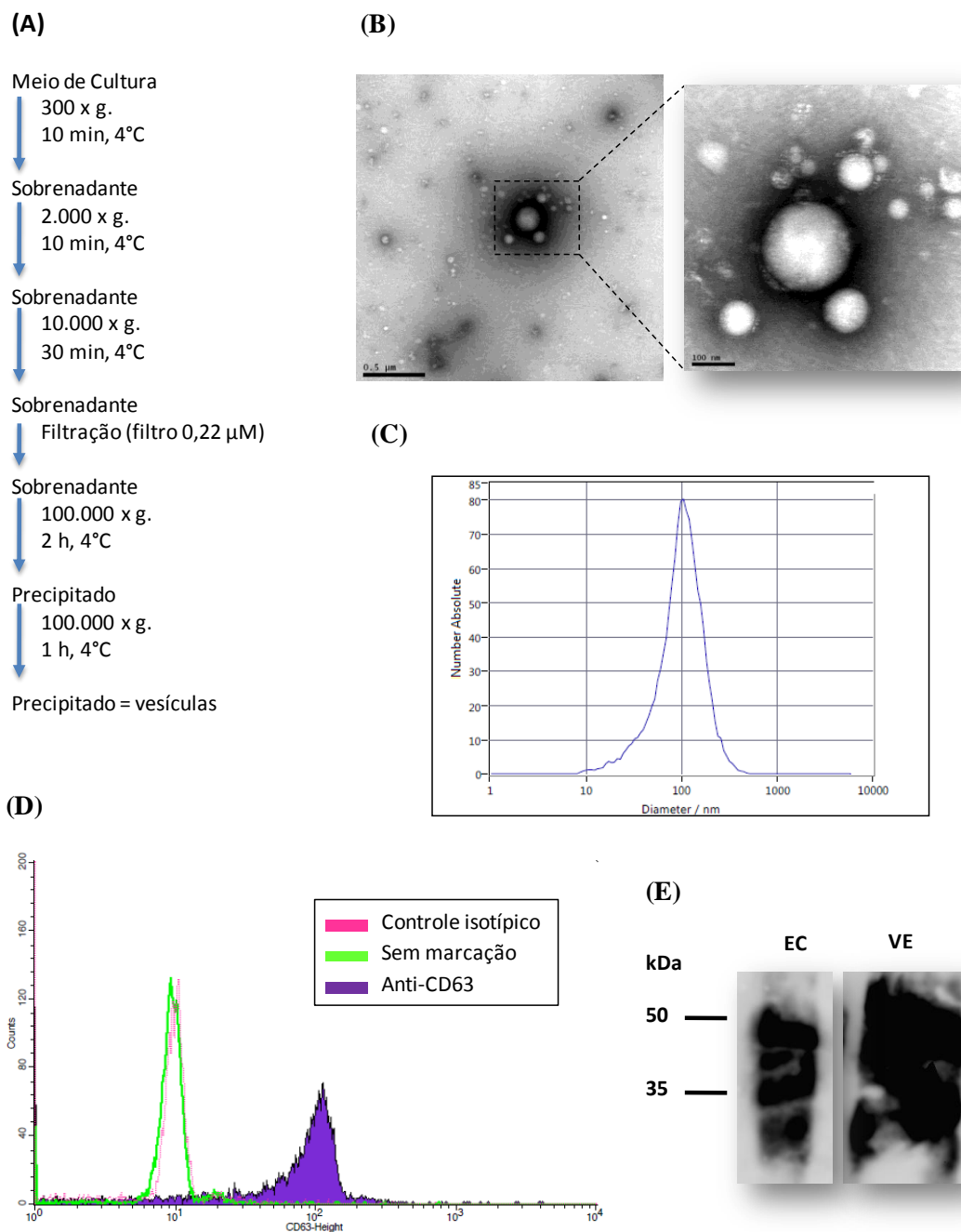


Figura 13. Isolamento e caracterização das VEs secretadas pelas células A549 sensíveis e resistentes a CDDP. (A) Representação esquemática do método de isolamento das vesículas por centrifugação diferencial e ultracentrifugação. (B) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das vesículas (barras de escala de 0,5 µM e 100 nm). (C) Gráfico de NTA mostrando a distribuição do diâmetro e quantidade das vesículas isoladas. (D) Histograma da análise das VEs por citometria de fluxo utilizando esferas magnéticas conjugadas com anticorpos anti-CD63. As esferas foram incubadas com anticorpo anti-CD63 marcado com FITC. (E) *Western blot* anti-CD63 em extrato celular (EC) e vesículas extracelulares (VE). Os resultados apresentados são representativos das VEs isoladas de células sensíveis e resistentes a CDDP.

Adicionalmente, foi verificada por *western blot* a presença de CD63 nos extratos proteicos das VEs (**Figura 13E**). Esses resultados confirmam o isolamento das VEs a partir do meio de cultivo das células A549 e RA-A549, validando o método escolhido e confirmam a presença de estruturas do tipo exossomo na população de VEs isoladas.

Como é possível observar na **Figura 14**, existe um padrão de proteínas diferencialmente expressas no extrato de células A549 em comparação ao extrato proteico das VEs secretadas por essas células.

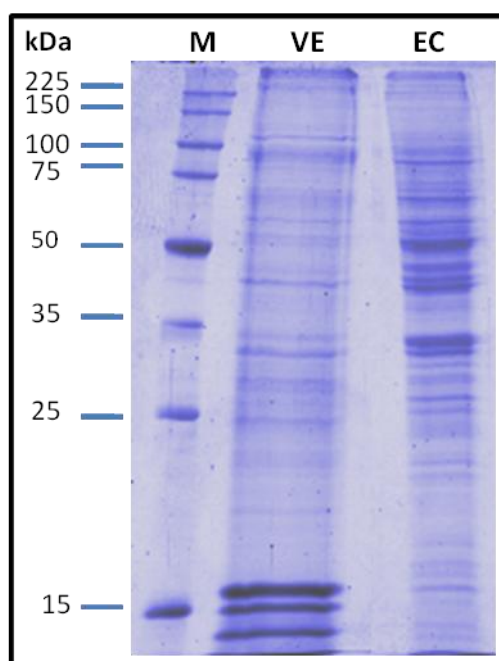


Figura 14. SDS-PAGE do extrato proteico de células A549 e de VEs isoladas do meio de cultivo por centrifugação diferencial e ultracentrifugação. Um padrão diferencial de proteínas expressas é observado entre o extrato proteico de células A549 em comparação ao extrato proteico de VEs secretadas por células A549. VE = Vesículas extracelulares; EC = Extrato celular; M = Marcador de massa molecular.

Embora, o conteúdo de moléculas das VEs tenha a tendência de refletir a função biológica e o estado patofisiológico da célula parental (Simpson *et al.*, 2008; de Jong *et al.*, 2012; Kucharzewska *et al.*, 2013; Hurwitz *et al.*, 2016), o conteúdo proteico das vesículas não necessariamente vai refletir o proteoma da célula original (Xiao & Cretoiu, 2017). Considerando que o carregamento de proteínas nessas estruturas poderá

ser variável e a sua composição ser diferente da célula secretora, tais informações justificam o perfil proteico de expressão diferencial entre as vesículas e as células de origem observado no SDS-PAGE.

3.4 Análise proteômica de VEs secretadas por células A549 e RA-A549

Para estudar melhor os mecanismos envolvidos na transferência de resistência a CDDP, foi realizada uma análise proteômica das VEs isoladas de células A549 sensíveis e resistentes a CDDP. No passo final de isolamento das vesículas secretadas pela sublinhagem RA-A549 (resistente a CDDP), foi observado um *pellet* de consistência viscosa, o qual não foi observado nas amostras de vesículas isoladas de células A549 sensíveis a CDDP. Dessa forma, a amostra de VEs das células RA-A549 foi separada em duas frações, correspondendo a *pellet* e sobrenadante, as quais foram analisadas separadamente por LC-MS/MS.

A análise de LC-MS/MS permitiu a identificação de um total de 225 proteínas diferentes presentes nas VEs das células A549 sensíveis e resistentes a CDDP (**Figura 15 e Tabela suplementar 1**). Foram identificadas 170 proteínas nas vesículas secretadas pelas células A549 sensíveis a CDDP e 153 proteínas nas vesículas isoladas das células RA-A549, considerando *pellet* e sobrenadante. Na comparação entre as VEs de células sensíveis e resistentes a CDDP, 72 proteínas foram identificadas exclusivamente nas vesículas isoladas das células A549, enquanto 55 proteínas foram identificadas somente nas vesículas secretadas pelas células RA-549 (**Figura 15 e Tabela suplementar 2**).

As proteínas compartilhadas entre as amostras de VEs de células sensíveis e resistentes a CDDP tiveram seu nível de abundância avaliado comparativamente nas diferentes amostras utilizando os valores de intensidade dos íons precursores (*Top 3*

Precursor Intensity) (Tabela suplementar 1). Na Tabela suplementar 3 são apresentadas as 32 e 28 proteínas com maior abundância significativa nas vesículas das células resistentes e sensíveis a CDDP, respectivamente, assim como os valores de *fold change*.

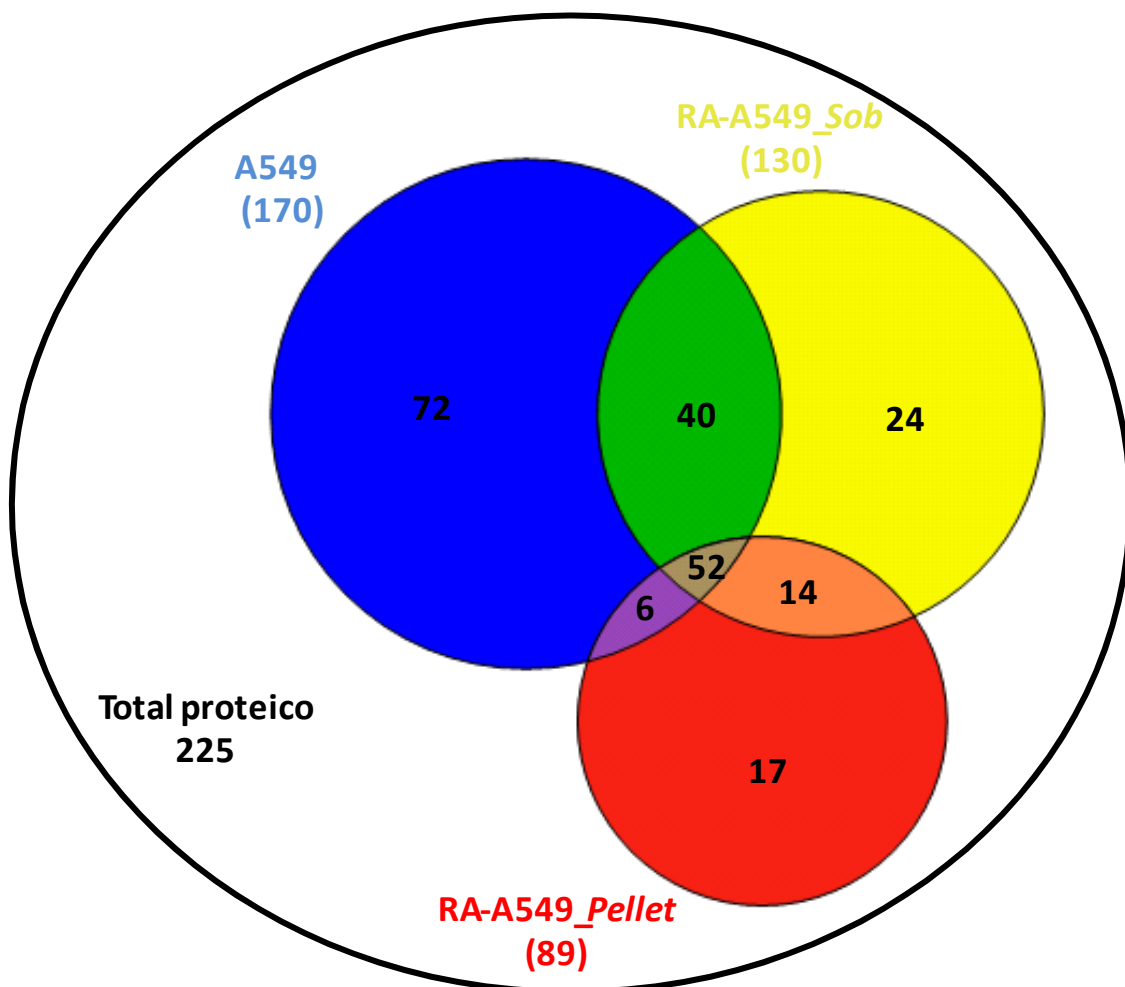


Figura 15. Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas por LC-MS/MS nas VEs isoladas de células A549 sensíveis e resistentes a CDDP. Estão indicados os números de proteínas exclusivas de cada amostra, assim como as proteínas compartilhadas entre as vesículas de cada tipo celular.

As proteínas exclusivas de cada amostra e com abundância diferencial entre as amostras foram agrupadas para a realização de análise de enriquecimento de termos de ontologia genética (GO, do inglês *gene ontology*) de processo biológico, componente celular e função molecular, utilizando o *plugin* ClueGO do programa Cytoscape (Tabelas suplementares 4, 5 e 6).

Os termos de GO semelhantes foram agrupados automaticamente pelo programa ou manualmente, sendo que os termos reagrupados podem ser visualizados nas **Tabelas suplementares 7 e 8**. Os termos considerados relevantes e enriquecidos funcionalmente foram filtrados dos dados gerais e podem ser visualizados nas **Figuras 16 e 17**. Para acessar as tabelas suplementares, entrar em contato (helierbalbinotti@gmail.com).

3.4.1 Análise de marcadores proteicos de VEs

Estudos proteômicos de VEs são direcionados para identificação de marcadores proteicos, importantes para a confirmação do isolamento de VEs, diagnóstico e prognóstico de câncer (Li *et al.*, 2017a). Como marcadores clássicos de VEs, identificamos as tetraspaninas CD9 e CD81, proteínas de membrana comumente utilizadas como marcadores específicos de exossomos, apesar de poderem estar presentes em menor abundância em outros tipos de vesículas (Yoshioka *et al.*, 2013; Kowal *et al.*, 2016). Embora tenhamos identificado essas proteínas em todas as amostras, as tetraspaninas apresentaram maior abundância em VEs secretadas por células resistentes a CDDP (*fold change* de 6,4 e 3,1 respectivamente para CD9 e CD81 em comparação com VEs de células sensíveis a droga). Esse resultado sugere que essas proteínas podem ser futuramente testadas e validadas como marcadores de resistência a CDDP em nosso modelo celular.

Jakobsen *et al.* (2015) analisaram o uso de um painel de 30 marcadores exossomais no diagnóstico de pacientes em estágio avançado de NSCLC. Os pesquisadores verificaram uma co-variação dos marcadores CD9 e CD81, sendo que CD81 se mostrou o marcador mais importante para a classificação dos pacientes. Esses dados ressaltam a importância de termos identificado essas proteínas em nossas amostras, pois podem assim ser utilizadas clinicamente também como marcadores da

resposta ao tratamento quimioterápico, em conjunto do diagnóstico de pacientes em estágio avançado de NSCLC.

Interessante citar que tetraspaninas são capazes de formar microdomínios funcionais na membrana, chamados de TEMs (*tetraspanin-enriched microdomains*), que interagem com uma gama de proteínas transmembrana receptoras e de sinalização do citoplasma. Além da utilidade experimental como marcadores de EVs, estudos sugerem que as tetraspaninas organizadas em TEMs podem apresentar papéis funcionais em VEs, tais como influenciar ou induzir a biogênese de EVs; modular a internalização, reciclagem e a composição de proteínas em VEs; o envolvimento na ligação e internalização de VEs in células-alvo; e, por fim, a capacidade de atuar como apresentadores de antígeno em VEs no contexto da resposta imunológica (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Mais além, as tetraspaninas organizadas na superfície de VEs como TEMs podem direcionar as VEs para a seleção das células-alvo, preparar o microambiente para a formação de nichos pré-metastáticos e atuar como facilitadoras do recrutamento de sinais moleculares em células receptoras (Lu *et al.*, 2017). Portanto, a presença diferencial das tetraspaninas nas VEs de células resistentes a CDDP pode indicar uma possível influência nos TEMs e um efeito distinto nas células-alvo que pode estar relacionado com a transferência de quimiorresistência.

Entre as proteínas associadas com a biogênese de endossomos multivesiculares, ou seja, conseqüentemente comuns em exossomos, identificamos a proteína Alix (PDCD6IP, do inglês *Programmed cell death 6-interacting protein*) em VEs oriundas de ambos os tipos celulares estudados, com maior abundância em vesículas de células RA-A549 (*fold change* de 3,7 em relação às VEs de células sensíveis). Um estudo demonstrou que essa proteína apresenta potencial prognóstico, havendo uma correlação da sua presença com uma sobrevivência reduzida em pacientes com NSCLC (Sandfeld-

Paulsen *et al.*, 2016). A maior abundância de Alix em VEs isoladas de células RA-A549 destaca essa proteína como alvo para futuros estudos visando também a sua avaliação como potencial biomarcador de tumores resistentes a CDDP. Outras classes de proteínas identificadas que são associadas a endossomos multivesiculares e utilizadas como marcadores de VEs são as anexinas e as Rab GTPases (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Outra classe relevante de marcadores proteicos identificados foram as proteínas de choque térmico (HSPs, do inglês *Heat Shock Proteins*), HSC70 (HSPA8), HSP27 (HSPB1), HSP70 (HSPA1B) e HSP90 (HSP90AB1). Frequentemente utilizadas como marcadores de exossomos (Campanella *et al.*, 2014), entretanto, Kowal *et al.* (2016) verificaram que HSC70 e HSP70 podem estar presentes em diferentes VEs, não sendo exclusivas de exossomos. Contudo, no último estudo citado também foi demonstrado que ADAM10 (sigla em inglês de *A Disintegrin And Metalloproteinase 10*) e sintenina-1 podem ser utilizadas como marcadores exclusivos de VEs pequenas (definidas pelos autores como população de VEs heterogêneas em diâmetro isoladas por método de centrifugação diferencial). Além disso, os autores sugerem a sintenina-1 como marcador específico de exossomos genuínos (enriquecidos com tetraspaninas). Nós identificamos ADAM10 exclusivamente em VEs de células resistentes a CDDP e sintenina-1 nas duas linhagens celulares estudadas, dados que reforçam o isolamento de VEs, principalmente do tipo exossomal.

O conjunto total de proteínas identificadas em nosso estudo foi comparado com as proteínas depositadas nos bancos de dados públicos de VEs, Vesiclepedia e Exocarta. Nós detectamos 49 proteínas entre as 100 mais frequentemente identificadas em estudos proteômicos de exossomos (lista disponível em www.exocarta.org). Apenas duas proteínas identificadas no presente trabalho não foram encontradas nos bancos de dados

de VEs, são elas: receptor de proteína quinase C ativada 1 (RACK1, sigla em inglês de *Receptor of Activated Protein C Kinase 1*) e proteína dedo de zinco 90 (ZFP90, sigla em inglês de *Zinc Finger Protein 90*).

A proteína ZFP90 foi identificada em amostras de vesículas de células A549 e RA-A549 (*pellet*), sendo que sua abundância não teve diferença estatística significativa entre as amostras em questão. Diferentes proteínas de dedo de zinco já foram relacionadas com a quimiorresistência em tumores (Jen & Wang, 2016), entretanto não foram encontrados dados na literatura sobre essa função para a proteína ZFP90.

Por outro lado, a proteína RACK1 já foi estudada em relação ao seu papel na resistência tumoral a tratamentos com drogas. Essa proteína apresenta uma versátil atuação, regulando tanto o processo pró-apoptótico quanto o antiapoptótico (Einhorn, 2013). Em nosso trabalho, essa proteína foi identificada exclusivamente em vesículas de células sensíveis a CDDP, o que pode indicar que a proteína tem expressão reduzida ou ausente em células RA-A549. Contudo, nosso grupo de pesquisa identificou RACK1 nessa linhagem em um estudo anterior (Dutra *et al.*, comunicação pessoal). Assim, a ausência de RACK1 nas VEs das células resistentes pode indicar que essas células tenham mecanismos para evitar a transferência intercelular dessa proteína via VEs ou pelo menos o empacotamento da proteína em VEs dessas células não deve ocorrer. Por consequência, esse processo regulatório negativo poderia evitar o desencadeamento da cascata de sinalização de apoptose em células receptoras.

Em suma, a identificação de marcadores proteicos clássicos de VEs, assim como de proteínas comuns depositadas em bancos de dados, nas nossas amostras reforça e confirma o isolamento de VEs secretadas pelas linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano estudadas neste trabalho.

3.4.2 Proteínas na fração *pellet* da amostra de VEs de células RA-A549

Após o isolamento das VEs de células A549 resistentes, nós realizamos a separação da amostra obtida em duas frações: uma com consistência viscosa (*pellet*) e outra aquosa (sobrenadante). Essas duas frações foram analisadas por LC-MS/MS, a fim de verificarmos diferenças proteicas que possam explicar esse aspecto diferencial observado entre as amostras. Essa consistência pode ser devido à presença de moléculas contaminantes que possam ter sido copurificadas com a VEs durante a ultracentrifugação (Konoshenko *et al.*, 2018). Entretanto, como o método de isolamento das VEs utilizado foi o mesmo para ambas as linhagens celulares e apenas uma amostra apresentou a característica, é mais provável que seja uma característica específica da própria amostra e não um artefato experimental.

Em uma análise geral, a amostra de *pellet* apresenta um conjunto de proteínas exclusivas ligadas à organização da matriz extracelular (MEC), como o colágeno tipo XVIII, basigina, nidogenina-2, prolil 3-hidroxilase, PDGFA (sigla em inglês de *Platelet-derived growth factor subunit A*) e SMOC-1. A proteína HSPG2, também associada à membrana basal, apresentou maior abundância no *pellet* em comparação com o sobrenadante (*fold change* de 1,7). Além disso, na amostra *pellet* observamos a ocorrência de diferentes tipos de queratinas (tipo 1, 2, 9 e 10), todas identificadas exclusivamente nessa fração amostral. As queratinas são proteínas de citoesqueleto que interagem com a MEC (Windoffer *et al.*, 2011). Por isso, a análise de categorização funcional comprova que a amostra de VEs secretadas por células RA-A549, no geral, apresenta enriquecimento de proteínas relacionadas à organização da MEC (ver **Figura 16**).

A MEC é uma rede de proteínas fibrosas, tais como colágenos e elastinas, imergidas em um meio intersticial viscoso rico em glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (Muiznieks & Keeley, 2013; Yue, 2014). Soluções compostas por proteínas fibrosas apresentam alta viscosidade (Rogers, 2011), assim a abundância de proteínas de matriz pode ser o motivo do estado viscoso apresentado na fração *pellet* da amostra de VEs isoladas de células RA-A549. Queratinas também são proteínas do tipo fibrosas (Ramms *et al.*, 2013), logo a presença exclusiva desse grupo proteico na fração *pellet* reforça a hipótese de que o aspecto viscoso apresentado se deve à presença dessas proteínas.

Além da expressiva quantidade de proteínas de MEC, identificamos também na fração *pellet* do isolado de VEs de células RA-A549 uma maior abundância de histonas e da proteína BANF1, uma proteína de ligação ao DNA. Foram também identificadas exclusivamente no *pellet* as proteínas BASP1 e DNA topoisomerase 1, proteínas de ligação ao DNA. VEs são conhecidas por carregar proteínas, RNAs e lipídios, assim como moléculas de DNA (Lynch *et al.*, 2017). Corpos apoptóticos são um tipo de vesícula, cujo diâmetro varia de 50-5000 nm, que comumente carregam núcleo degradado, fragmentos de DNA genômico, histonas e organelas, um reflexo da morte celular programada (Suchorska & Lach, 2016). Exossomos também podem conter moléculas de DNA, sendo possíveis alvos de marcação molecular para detecção de câncer e metástases (Thakur *et al.*, 2014). A secreção de exossomos pode ter a função de manter a homeostase celular, devido à remoção de fragmentos de DNA citoplasmático prejudiciais para as células (Takahashi *et al.*, 2017). O aumento de estresse celular, como o ligado à via de reparo de DNA, pode contribuir com o aumento de ácidos nucleicos no citoplasma, que então são encapsulados pelas vesículas (Kalluri & Lebleu, 2016).

Embora não tenhamos identificado e comparado a quantidade de material genético nas VEs secretadas pela linhagem A549 e pela sublinhagem RA-A549, é possível que as VEs isoladas de células resistentes tenham uma maior quantidade de DNA, pois: a) apresentam mais abundância de histonas, com destaque para a histona H4 que é extremamente mais abundante em VEs de RA-A549 em relação às VEs de células sensíveis (*fold change* de 21.038,5); b) há enriquecimento de proteínas ligadas a componentes celulares, tais como *nucleossomo* e *heterocromatina*, e a função molecular de *ligação ao DNA nucleossômico* (**Figura 16**). Considerando que soluções contendo DNA genômico apresentam viscosidade, uma maior quantidade de DNA nas VEs isoladas de células resistentes a CDDP pode contribuir para a consistência observada na amostra. Estudos futuros devem ser realizados para confirmar essas hipóteses.

3.4.3 Análise de proteínas e termos de ontologias de VEs de células A549 sensíveis e resistentes potencialmente envolvidas na transferência de resistência a CDDP

Como nosso trabalho tem o foco de analisar proteínas de vesículas que possuam relação com a possível transferência intercelular de resistência à CDDP, nós analisamos e discutimos as proteínas e termos de ontologias que apresentaram presença exclusiva e maior abundância/enriquecimento na amostra de vesículas isoladas de células resistentes a CDDP em comparação com a linhagem sensível a droga. Em relação aos termos de GO, foram analisados os processos biológicos mais representados, assim como os considerados importantes e mais conhecidos na literatura, sendo que proteínas específicas de cada termo foram aprofundadas quanto as suas funções e relevância no contexto de transferência de resistência tumoral a CDDP. Dessa forma, nossos resultados apontaram proteínas e processos envolvidos na transferência intercelular de quimiorresistência.

Termos de Ontologias Vesículas RA-A549

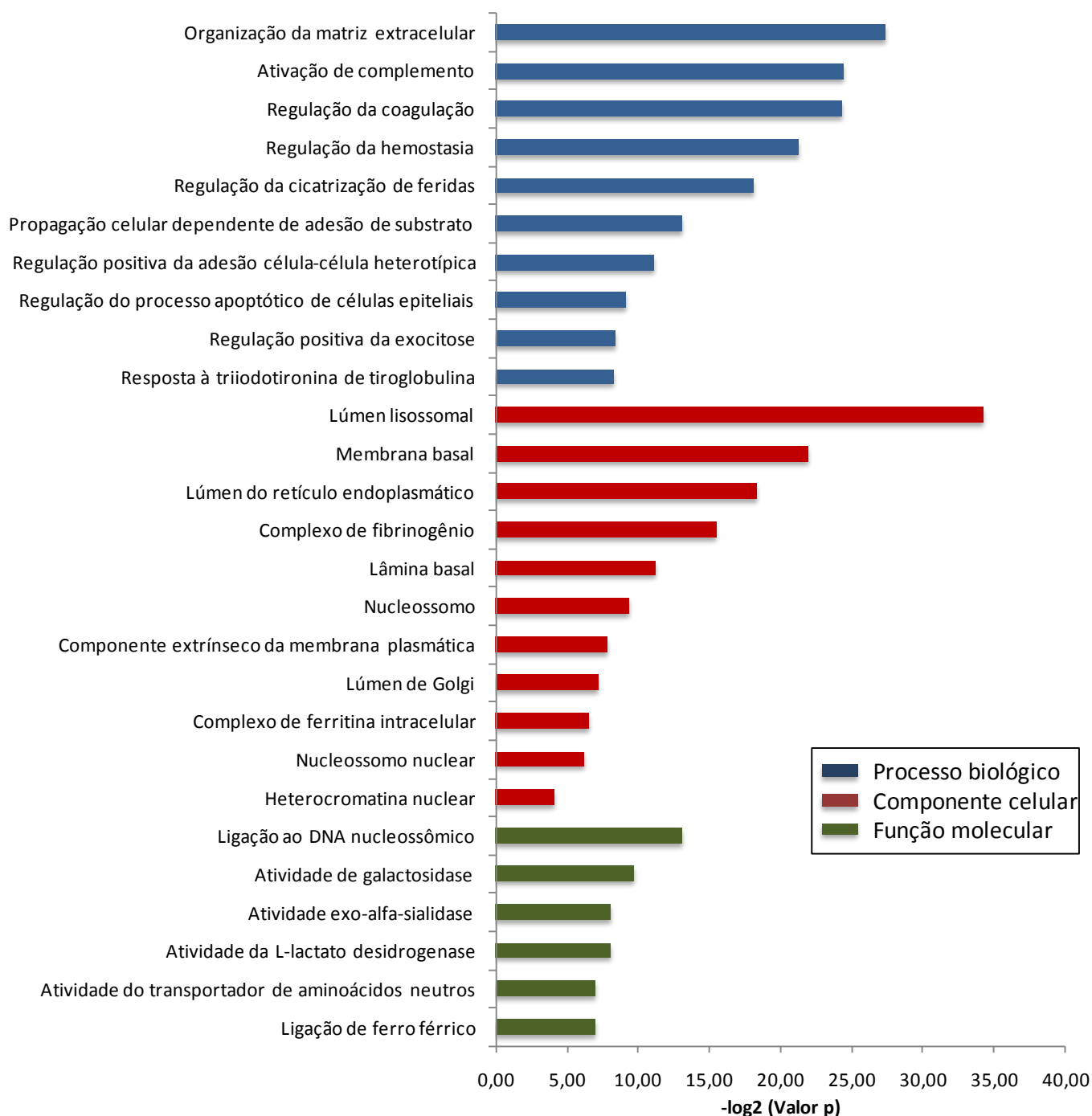


Figura 16: Classificação funcional das proteínas identificadas exclusivamente ou com maior abundância significativa nas VEs isoladas de células RA-A549 (resistentes a CDDP) em comparação às VEs de células A549 (sensíveis a CDDP). São mostrados apenas os 10 termos de *gene ontology* (GO) para cada classe funcional (processo biológico, componente celular e função molecular) mais enriquecidos significativamente na amostra de VEs de RA-A549 em relação à de A549. As barras do gráfico representam o valor de $-\log_2$ (Valor p) para cada grupo de GO.

Termos de ontologias Vesículas A549 Sensível

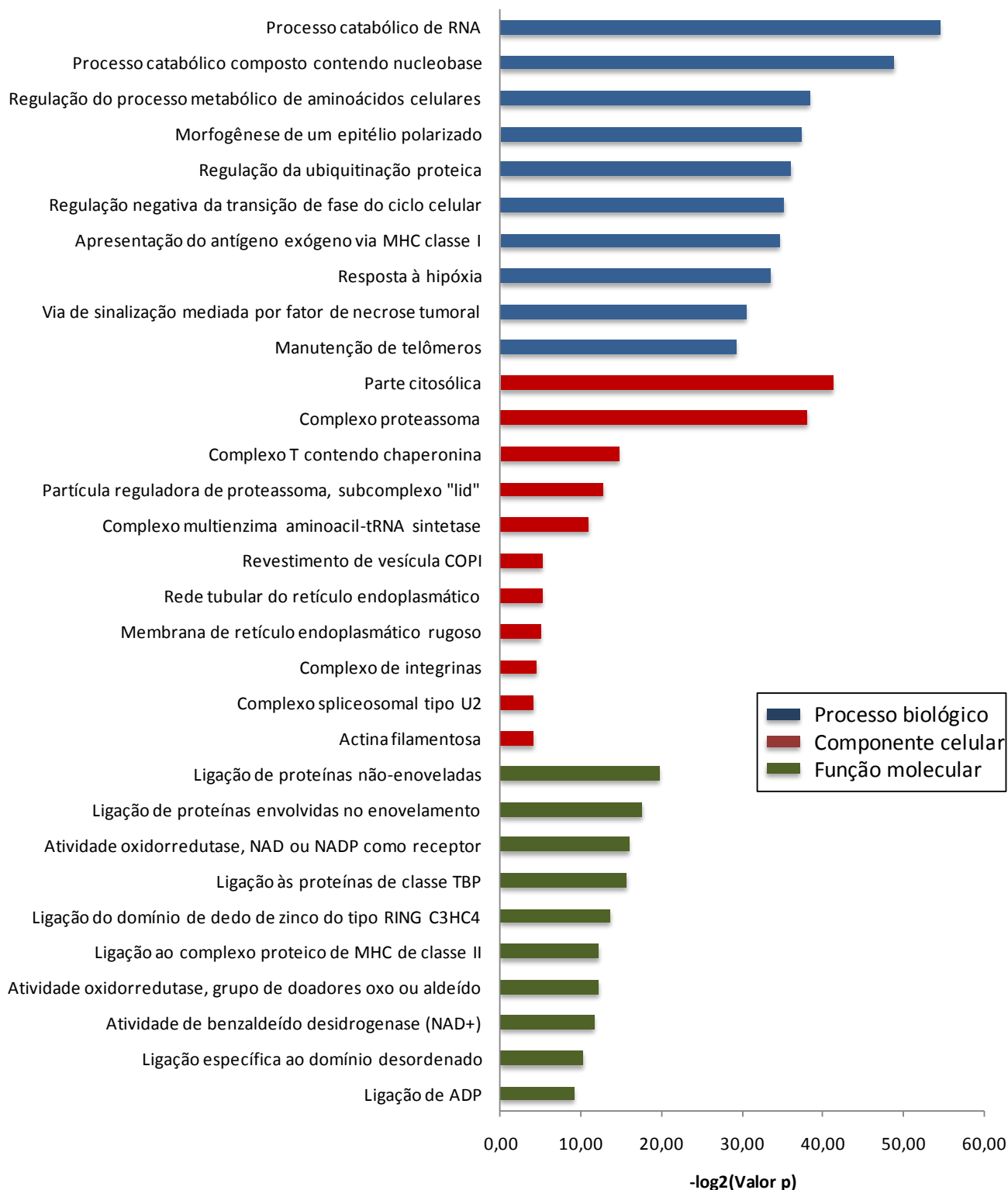


Figura 17: Classificação funcional das proteínas identificadas exclusivamente ou com maior abundância significativa nas VEs isoladas de células A549 (sensíveis a CDDP) em comparação às VEs de células RA-A549 (resistentes a CDDP). São mostrados apenas os 10 termos de *gene ontology* (GO) para cada classe funcional (processo biológico, componente celular e função molecular) mais enriquecidos significativamente na amostra de VEs de A549 em relação à de RA-A549. As barras do gráfico representam o valor de $-\log_2(\text{Valor } p)$ para cada grupo de GO.

3.4.3.1 Organização e modulação da estrutura da MEC

O processo biológico identificado como o mais enriquecido em vesículas isoladas de células RA-A549 foi a *organização da estrutura da matriz extracelular* (MEC), representado por 15 proteínas detectadas nas amostras de sobrenadante e *pellet* reunidas (**Figura 16** e **Tabela suplementar 7**). Dentre essas proteínas destacam-se colágeno do tipo XVIII, lamininas, agrin, perlecan, vitronectina, ADAM10 e basigina. Além disso, a *membrana basal* foi o segundo componente celular mais enriquecido nas análises de ontologias de vesículas de células RA-A549 (**Figura 16**).

Células tumorais podem adquirir quimiorresistência quando cultivadas com componentes da MEC, tais como colágenos, laminina e fibronectina (Hoyt *et al.*, 1996; Sethi *et al.*, 1999). VEs podem atuar na modulação da MEC, influenciando na promoção de processos de invasão e migração de células cancerígenas, se apresentando, assim, como um importante componente na progressão tumoral (Becker *et al.*, 2017; Bebelman *et al.*, 2018). VEs também podem transferir metaloproteinases de matriz, as quais possibilitam a degradação da MEC. As metaloproteinases de matriz causam alterações na MEC que levam a preparação de sítios tumorais pré-metastásicos (Hakulinen *et al.*, 2008; Somasundaram & Herlyn, 2012).

Uma importante metaloproteinase de remodelação da MEC e identificada em VEs secretadas por células RA-A549 é a ADAM10. Essa proteinase transmembrana já foi identificada com alta expressão em células de NSCLC, principalmente em tecidos metastáticos. A ADAM10 pode atuar na promoção de migração e invasão de células de NSCLC por meio da ativação da via de sinalização Notch1 (Guo *et al.*, 2012). Fibroblastos associados a câncer são capazes de secretar exossomos contendo alta abundância de ADAM10, que por sua vez é capaz de ativar Notch1 nas células

receptoras dessas VEs. A ativação dessa via pelos exossomos mediada por ADAM10 sugere um envolvimento dessa proteína na manutenção de células-tronco de câncer. Além disso, por meio da atividade de ADAM10, ocorre o aumento da mobilidade celular tumoral pela ativação da via de sinalização RhoA (Shimoda *et al.*, 2014). A redução da expressão de *Notch1* em células A549 tem como efeitos a inibição da proliferação celular e aumento da sensibilidade a CDDP, logo há indícios de que essa via de sinalização está envolvida com a resistência celular a essa droga (Deng *et al.*, 2017). ADAM10 já foi também correlacionada à proliferação, migração, invasão e quimiorresistência a CDDP em células de câncer de bexiga (Fu *et al.*, 2014). Em suma, esses estudos indicam que ADAM10 pode estar associada à transferência de resistência a CDDP entre células tumorais por meio de VEs.

Outra importante proteína identificada exclusivamente em VEs de células RA-A549 foi a basigina (conhecida também como CD147 ou EMMPRIN, sigla em inglês de *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*), uma glicoproteína transmembrana. Essa proteína possui funções relacionadas com o câncer, tais como induzir a degradação de MEC e membrana basal, promovendo a proliferação tumoral, angiogênese, adesão a proteínas da matriz e desenvolvimento de quimiorresistência (Nabeshima *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2016). Yang *et al.* (2007) mostraram que o bloqueio da expressão de CD147 em uma linhagem de câncer de ovário resistente a CDDP leva ao acúmulo da droga intracelularmente e redução do seu efluxo. Zeng *et al.* (2011) demonstraram que o silenciamento de CD147 em células A549 resistentes a CDDP resulta no aumento inibitório de proliferação pela droga. Os pesquisadores também observaram que a expressão positiva de CD147 em pacientes com NSCLC está correlacionada com uma resposta pobre a quimioterapia baseada em CDDP, evidenciando a importância dessa proteína quanto à resistência clínica.

Em linhagens de carcinoma de pulmão, foi demonstrado que CD147 é secretada através de microvesículas. Embora as VEs tenham apresentado instabilidade e quebra rápida, as mesmas foram capazes de liberar fragmentos de membrana contendo a CD147 ativa. Essa liberação resultou na indução de metaloproteinases de matriz (Sidhu *et al.*, 2004). Vesículas secretadas por células tumorais contendo CD147 são capazes de estimular atividades angiogênicas, de proliferação e invasão celular através de mecanismos mediados por essa proteína (Millimaggi *et al.*, 2007; Arendt *et al.*, 2014; Menck *et al.*, 2015). A transferência intercelular dessa proteína via VEs pode ser um fator importante na indução de quimiorresistência através da modulação de processos de estruturação e organização da MEC no contexto tumoral.

Estudos indicam que a MEC pode impedir a penetração de agentes terapêuticos, contribuindo assim com a resistência tumoral. Por meio da utilização de uma camada multicelular contendo uma MEC de laminina e colágeno, pesquisadores verificaram uma baixa penetração de CDDP. Portanto, o alcance limitado de CDDP ao tecido tumoral devido a MEC pode ser um mecanismo de quimiorresistência em tumores sólidos (Tannock *et al.*, 2002). Células crescendo em contato possuem mais resistência a CDDP do que células em crescimento desagregado (Trédan *et al.*, 2007). Tumores mais resistentes a penetração de macromoléculas apresentavam uma rede de colágeno extensa, sendo que essa resistência pode ser devido a ligação e estabilização do componente de glicosaminoglicano da MEC (Netti *et al.*, 2000). A densa MEC e os componentes do estroma tumoral podem aumentar a pressão do fluido intersticial, o que limita a inserção de agentes terapêuticos no tratamento anticâncer (Yu & Tannock, 2012). Ji *et al.* (2017) demonstraram que células de tumor pancreático secretam uma matriz no estroma tumoral capaz de formar uma barreira à recepção e entrada de drogas no tecido. Em síntese, a MEC pode desempenhar um papel importante na proteção das

células tumorais da ação de quimioterápicos, tais como a CDDP. Essa proteção ocorre devido ao reforço na adesão e conexão entre as células e/ou devido ao impedimento de penetração da droga na célula-alvo.

Além disso, altos níveis de fibrinogênios podem aumentar a viscosidade sanguínea, reduzindo o seu fluxo e a entrega de agentes antitumorais (Stewart, 2007). Sheng *et al.* (2013) verificaram que pacientes de NSCLC com hiperfibrinogenemia possuem um alto risco de progressão do câncer e morte se comparado com pacientes com nível considerado normal. A deposição de fibrinogênio na MEC serve como suporte de ligação de fatores de crescimento e promove respostas celulares de adesão, proliferação e migração durante a angiogênese e crescimento tumoral (Simpson-haidaris & Rybarczyk, 2001). Logo, a presença de fibrinogênios em VEs secretadas pelas células resistentes a CDDP pode indicar a participação desses elementos na MEC, onde podem participar do bloqueio do fluxo da droga ou de funções de suporte estrutural e sinalização de processos que podem auxiliar no aumento de resistência química.

Em nosso estudo, identificamos subunidades de laminina (subunidade alfa-5, beta-1 e gamma-1) em VEs de células A549 sensíveis e resistentes. As subunidades alfa-5 e gamma-1 foram encontradas reguladas positivamente em VEs de células RA-A549. Além disso, detectamos exclusivamente o colágeno do tipo XVIII em VEs secretadas por essas células. A ligação de proteínas de MEC, tais como lamininas e colágenos, em receptores celulares pode induzir a sinalização intracelular, reforçando a capacidade tumoral em resistir aos processos de indução de apoptose, em resposta à ação de drogas terapêuticas (Pickup *et al.*, 2014). Em um tumor intraocular, foi mostrada a redução nas taxas de apoptose em resposta ao tratamento com CDDP nas células tumorais aderidas a proteínas de MEC, tais como laminina, fibronectina e

colágeno IV. Assim, foi sugerido que a interação com a matriz seja a causa do fenótipo de resistência (Bérubé *et al.*, 2005).

Colágeno XVIII, agrin e perlecan são glicoproteínas que contribuem para formação da estrutura da membrana basal, denominadas como HSPGs por possuírem cadeias de sulfato de heparana (Sarrazin *et al.*, 2011). Colágeno XVIII foi identificado exclusivamente em VEs de RA-A549, enquanto agrin e perlecan (ou HSPG2 ou *Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein*) apresentaram maior abundância nessas VEs em comparação às VEs de células sensíveis a CDDP. Em exossomos oriundos de células de glioblastoma foi evidenciada a presença de HSPGs e que essas proteínas são importantes funcionalmente para ativar sinalização associada à migração celular (Christianson *et al.*, 2013). Em células de mieloma, foi descoberto que cadeias de sulfato de heparana são necessárias para a retenção de fibronectina na superfície de exossomos. A fibronectina dessas VEs interage com células-alvo por meio da sua ligação com as cadeias de sulfato de heparana, sendo que essa interação estimula a progressão tumoral (Purushothaman *et al.*, 2016). Essas cadeias são necessárias para sinalização *Hedgehog* e perlecan regula o nível de atividade dessa sinalização. Em tumores epiteliais de ovário, foram associados os efeitos potenciais do sinal *Hedgehog* com o desenvolvimento de resistência a CDDP (Datta *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2018). A proteína perlecan apresenta um domínio considerado como pró-angiogênico (Schaefer *et al.*, 2017). No conjunto, essas informações sugerem que HSPGs, presentes com maior abundância em VEs de células A549 resistentes, podem ser importantes na regulação de processos envolvidos com a resistência tumoral. Como processos, destacamos a angiogênese, modulação da matriz e sinalização intracelular que induz à migração e progressão tumoral. A alta abundância de perlecan em VEs de células A549 resistentes a CDDP (*fold change* de 6,6 e 11,2 respectivamente em amostra de sobrenadante e

pellet) torna-a um alvo interessante para estudos de marcação de diagnóstico, assim como alvo para desenho de drogas antitumorais.

Em resumo, as proteínas de organização da MEC identificadas podem estar relacionadas à transferência de quimiorresistência intercelular por atuarem na regulação de processos de adesão-agregação celular, impedindo a penetração de CDDP nas células-alvo. Além disso, essas proteínas podem induzir diversas sinalizações celulares, influenciando ou participando de processos de invasão, migração e progressão tumoral, apoptose, angiogênese, manutenção de células-tronco, preparação de sítios metastáticos e internalização de VEs.

3.4.3.2 Modulação da cascata de sinalização do sistema complemento

Em nosso trabalho, foram identificadas diferentes proteínas-componentes da cascata de *ativação do complemento*, tais como C3, C5, CD55, fator D e CD46, exclusivas ou em maior abundância nas VEs de células resistentes a CDDP (**Figura 16 e Tabela suplementar 3**). São conhecidas três via de sinalização da cascata de ativação do sistema complemento (SC), de modo que todas estão envolvidas na geração de C3 convertase, proteína cuja função é a clivagem de C3 em duas moléculas nomeadas de C3a e C3b. Também é possível a indução de uma via alternativa em que ocorre a hidrólise espontânea de C3, sendo que neste caso há a formação de C3 (H₂O) e a ligação dessa molécula com o fator B, que posteriormente pode ser clivado pelo fator D, gerando alternativamente a C3 convertase. A molécula C3b pode se associar às C3 convertases para formar a C5 convertase, que por sua vez atua na clivagem de C5 em C5a e C5b. A molécula C5b pode interagir com outras proteínas do sistema (C6, C7, C8 e C9), conseqüentemente formando o complexo proteico MAC (sigla em inglês de *Membrane Attack Complex*), o qual está envolvido no processo de criação de poros na

membrana plasmática (Nesargikar *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2018). Embora o MAC possa causar lise em determinadas células, estudos indicam que o complexo pode ter a função de ativar fatores de transcrição e transdução de sinais, o que resulta na indução de progressão do ciclo celular e inibição do processo de apoptose (Fosbrink *et al.*, 2005; Tegla *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, o SC está relacionado com o reconhecimento e combate das células tumorais. Por outro lado, esse sistema pode atuar de forma contrária, podendo ser uma via de sinalização de promoção de atividades positivas para a progressão tumoral. As células tumorais podem evadir os efeitos de ataque do SC, mas também fazer uso de moléculas participantes desse processo em benefício próprio. Esse uso tem como propósito equilibrar a ativação e a inibição do SC, cuja vantagem é iniciar a cascata do processo sem sofrer as consequências prejudiciais do mesmo (Kolev *et al.*, 2011; Pio *et al.*, 2013). VEs podem contribuir com a neutralização da resposta imunológica contra células tumorais, participando de mecanismos de evasão do sistema imune, como a ativação de células supressoras, modulação da apresentação de antígenos e indução da apoptose de linfócitos T. Assim, VEs podem atuar no controle do sistema imune por meio da exposição de suas proteínas de superfície, no processo pró-inflamatório através da ativação de citocinas intracelulares e na modulação de processos imunossupressores devido a transferência de miRNAs (Czernek & Döchler, 2017).

Diferentes linhagens celulares de câncer de pulmão, inclusive A549, são capazes de ativar o SC e secretar níveis detectáveis de C5a. Resultados experimentais mostram que C5a induz angiogênese e imunossupressão, resultando em um microambiente favorável para o progresso do câncer pulmonar (Corrales *et al.*, 2012). De fato, C5a induz a proliferação de células A549 através do aumento da expressão de fatores de

transcrição, que por sua vez reforçam a transcrição de um fator de diferenciação de crescimento (Zhao *et al.*, 2018).

Há proteínas reguladoras do SC ligadas à membrana, como CD55 (fator de aceleração de decaimento), CD46 (proteína cofactor de membrana) e CD35, que atuam no bloqueio da via de ativação de C3, e ainda CD59, que funciona como um bloqueador da montagem de MAC (Fishelson *et al.*, 2003). Em vesículas de RA-A549 foram identificadas as proteínas CD55 e CD46, o que sugere uma sinalização para regulação da ativação de C3. CD55 presente em exossomos de células apresentadoras de antígeno tem o papel de proteger essas VEs da lise pelo SC devido à inibição da deposição de C3b na membrana exossomal. Esses dados sugerem que essa proteína pode aumentar a sobrevivência de VEs em circulação no meio extracelular (Clayton *et al.*, 2003).

A presença de CD55 e CD46 nas VEs de células RA-A549 pode também estar relacionada com a resistência a CDDP. Zhao *et al.* (2009) demonstraram que CD55 e CD46 são altamente expressos em células A549. Entretanto, CD55 apresenta diminuição de expressão 24 e 48 h após o início do tratamento com CDDP, recuperando o mesmo nível de expressão apenas 72 h após o início do tratamento, enquanto CD59 tem expressão reduzida ao longo do tratamento. Logo, já foi verificada em células A549 a expressão dessas proteínas, assim como outras proteínas de SC (Cooper *et al.*, 2016), e a sua expressão pode ser modulada pelo tratamento com CDDP, demonstrando a sua possível relação com a resistência à droga.

Em tumores endometrióides de ovário resistente a CDDP, pesquisadores demonstraram que CD55 é necessário para a manutenção de resistência a CDDP, de células-tronco tumorais e para autorenovação. Nesses fenótipos, o CD55 atua de maneira independente ao SC, a partir da sinalização intracelular via LIME, uma proteína

adaptadora transmembrana que ativa as vias de sinalização: ROR2-JNK, direcionada para regular a autorenovação, e LCK (sigla em inglês de *Lymphocyte-specific Protein Tyrosine Kinase*), cuja função é induzir a expressão de genes de reparo ao DNA, tais como *MLH1* e *BRCA1* (Saygin *et al.*, 2017).

Outra importante proteína detectada em nosso estudo foi a clusterina, encontrada positivamente regulada em vesículas de células resistentes, em relação às vesículas de células sensíveis. Essa proteína, no contexto da cascata de sinalização de SC, apresenta a função de impedir a montagem dos componentes do MAC, por se ligar em C7, C8 ou C9, ou seja, é um regulador inibitório da cascata de SC (McDonald & Nelsestuen, 1997). Estudos mostram que a CDDP ativa a expressão de clusterina na forma secretada (sCLU), sendo que sua expressão elevada resulta em aumento de resistência a CDDP em células A549, devido a redução dos processos apoptóticos (Zhang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). Clusterina é altamente secretada em linhagens de adenocarcinoma de pulmão, assim como em soro de pacientes com esse câncer, indicando seu grande potencial como marcador de prognóstico e diagnóstico (Chu *et al.*, 2017). Embora a secreção de clusterina tenha sido atribuída à via clássica por peptídeo-sinal, esses trabalhos não analisaram se essa proteína poderia estar presente em VEs.

Em resumo, proteínas secretadas por meio de VEs podem atuar na regulação de ativação/atenuação do sistema imune como uma forma de escape das ações do complemento. Como em nossos experimentos *in vitro* reduzimos a complexidade de um microambiente tumoral a um sistema com duas linhagens apenas, interagindo ou não com a CDDP, os efeitos mais prováveis dessas proteínas identificadas estão relacionados com a sinalização de mecanismos de resistência tais como o controle do processo apoptótico, regulação do ciclo celular, reparo de DNA e autorrenovação. Por outro lado, a comunicação intercelular analisada pode acontecer e ser também

importante no contexto mais amplo que envolva o estroma tumoral, assim como na interação com outros sistemas biológicos (sistema imune, p. ex.).

3.4.3.3 Regulação da coagulação sanguínea e progressão tumoral

Em VEs derivadas de células RA-A549 verificamos o enriquecimento funcional do processo de *regulação da coagulação sanguínea* (**Figura 16**). As proteínas identificadas exclusivamente nessas VEs e relacionadas ao processo citado foram os fibrinogênios, a queratina do tipo 2 e o fator de crescimento PDGFA (**Tabela suplementar 2**). As proteínas CD9 e vitronectina também foram reunidas ao *cluster* e foram identificadas com maior abundância nas VEs oriundas de células resistentes a CDDP em comparação às VEs de células A549 (**Tabela suplementar 3**).

O processo de coagulação pode ser ativado por células cancerígenas (Falanga *et al.*, 2013). Estudos mostram que VEs liberadas por tumores podem transferir mediadores pró-inflamatórios para células receptoras, que se tornam ativadas e podem secretar fatores que promovem a coagulação (Van Der Pol *et al.*, 2012; Green *et al.*, 2015). O processo de coagulação já foi associado à progressão tumoral (Falanga *et al.*, 2013). O aumento da proliferação celular pode ser um mecanismo de quimiorresistência tumoral, uma vez que reduz a eficácia da droga utilizada (Jones *et al.*, 2016). Em um estudo *in silico*, Sun *et al.* (2014) analisaram assinaturas de genes relacionados às respostas a drogas anticâncer, identificando a *cascata de complemento e coagulação* como uma das vias mais enriquecidas em células de NSCLC. Portanto, a regulação de ativação da coagulação sanguínea mediada por VEs pode ser um mecanismo ligado a transferência de resistência a drogas.

Embora seja mais conhecida como marcador molecular de VEs, a proteína CD9 pode desempenhar outros papéis importantes. Essa proteína é capaz de induzir a

ativação de plaquetas, promover a estabilidade de agregação plaquetária e reforçar a ligação de fibrinogênios (Zhang, 2013), portanto CD9 pode desempenhar função pró-coagulante. Soekmadji *et al.* (2017) verificaram que VEs enriquecidas com CD9 e secretadas por células de câncer de próstata são capazes de induzir a proliferação celular em condições de privação de andrógenos. Os autores verificaram ainda que VEs positivas para CD9 são mais abundantes em amostras de plasma de pacientes com câncer de próstata em comparação a pacientes com hiperplasia prostática benigna. Portanto, VEs podem atuar na progressão tumoral mediada por CD9, provavelmente devido à ativação do processo de coagulação.

O complexo fibrinogênico foi um dos componentes celulares mais enriquecidos em VEs de RA-A549 (**Figura 16**). Os fibrinogênios apresentam capacidade de aumentar os efeitos do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) no crescimento celular de linhagens de câncer de próstata e pulmão, entre essas, A549. Os fibrinogênios necessários para esse efeito podem ser os sintetizados endogenamente nessas linhagens (Sahni *et al.*, 2008). O FGF-2 é um fator já referenciado como sendo importante para aquisição de resistência a CDDP em diferentes células tumorais (Miyake *et al.*, 1998; Carmo *et al.*, 2011; Salm *et al.*, 2013). Assim, é possível que a presença de CD9 nas vesículas de células resistentes possa exercer função de estabilizar fibrinogênios, que, por sua vez, podem desempenhar papéis ligados a ativação de fatores de crescimento associados a mecanismos regulatórios de resistência a drogas.

Fatores de crescimento são elementos-chave para o desenvolvimento e progressão de câncer (Witsch *et al.*, 2010). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *Platelet-Derived Growth Factor*), foi identificado exclusivamente nas amostras de *pellet* de vesículas secretadas pelas células RA-A549. As isoformas de PDGF são glicoproteínas que regulam a angiogênese por diferentes

mecanismos de sinalização, tais como AKT e MAPK. A PDGF já foi identificada em VEs de células tumorais, tendo papel fator pró-angiogênico e auxiliando na proliferação tumoral (Sullivan *et al.*, 2017). Lopatina *et al.* (2014) verificaram que o tratamento de células-tronco mesenquimais adipócitas com PDGF é capaz de estimular a secreção de VEs, modificar a composição de proteínas contidas nas VEs e reforçar seu potencial angiogênico. Essas VEs foram capazes de induzir a proliferação e invasão tecidual de células endoteliais microvasculares humanas.

Pacientes com NSCLC apresentam uma correlação entre alta expressão de PDGF e um prognóstico negativo (Donnem *et al.*, 2008). Reinmuth *et al.* (2009) estabeleceram uma linhagem de A549 com a isoforma A de PDGF mutada, a qual apresentou redução no crescimento celular, provavelmente ligada a uma diminuição no recrutamento de células periendothelias. Células A549 submetidas a tratamento com um inibidor da atividade de quinase de PDGF apresentam supressão da proliferação e migração celular, além de indução de apoptose (Wang *et al.*, 2014b). Em células tumorais de testículo resistentes a CDDP, a via AKT é altamente ativada pelo receptor β de PDGF e seu ligante, sugerindo que essa interação possui um papel crítico no desenvolvimento de resistência a droga (Juliachs *et al.*, 2014). De acordo com Yu *et al.* (2015), a proteína FOXM1 ativa a expressão da isoforma A de PDGF, consequentemente aumentando a proliferação tumoral. FOXM1 é uma classe de fatores de transcrição que apresentam muitos papéis importantes no desenvolvimento tumoral, como contribuir para a formação de resistência celular a drogas terapêuticas (Wierstra, 2013). Essas informações indicam que PDGF pode atuar em mecanismos ligados a quimiorresistência, tais como aumento de proliferação, angiogênese e regulação de apoptose, e que as VEs podem ser veículos de transferência dessa proteína entre células tumorais e o estroma.

As proteínas identificadas nas VEs de células resistentes a CDDP conhecidas por atuarem na regulação da coagulação sanguínea podem ser aliadas na transferência de quimiorresistência entre células resistentes e sensíveis a droga, sugerindo que as VEs sejam o meio de comunicação utilizado nesse processo. Tal comunicação resulta em modificações nas vias de ativação dos processos coagulantes, que reforçam a progressão no contexto do estroma tumoral. Além disso, pode ocorrer a transferência e ativação de fatores de crescimento ligados à proliferação e migração celular, angiogênese e apoptose. Portanto, essa regulação pode explicar a passagem do fenótipo de resistência intercelular, mas também pode desempenhar um papel importante no contexto geral de interação do tumor com as demais células e sistemas biológicos.

3.4.3.4 Transportadores de aminoácidos neutros e síntese de glutatona

Na análise de enriquecimento de termos de ontologias presentes nas VEs de células RA-A549, verificamos o processo biológico de *transporte de aminoácidos neutros*, assim como a função molecular de *atividade do transportador transmembrana de aminoácidos neutros* (**Tabela suplementar 7** e **Figura 16**, respectivamente). Em relação a esse processo foram identificados os transportadores de aminoácidos SLC7A5 (exclusivamente em VEs de RA-A549), SLC1A5 e SLC3A2, ambos detectados em todas as amostras, porém com maior abundância em VEs de células resistentes (*fold change* de 9,1 e 3,5, respectivamente) em comparação às VEs de células sensíveis. Esses transportadores são proteínas transmembranas que geralmente apresentam elevada expressão em células tumorais. A internalização de aminoácidos por esses transportadores é essencial para a sobrevivência e o crescimento tumoral, os quais estão associados à formação de quimiorresistência (Li & Shu, 2014; Bhutia *et al.*, 2015). Aliado a isso, foi verificado que exossomos secretados por fibroblastos associados a câncer podem conter aminoácidos intactos e transferir os mesmos para células tumorais

privadas de nutrientes. As células tumorais utilizam esses aminoácidos disponíveis, promovendo o crescimento tumoral (Zhao *et al.*, 2016).

A proteína SLC1A5 é um transportador de influxo de glutamina, altamente expresso no citoplasma de células NSCLC, entre elas, A549. Nessas células, foi demonstrado que SLC1A5 é em parte o principal mediador de transporte de glutamina e que está relacionado à modulação do crescimento, autofagia, apoptose e estresse oxidativo tumoral. A expressão desse transportador é correlacionada a um prognóstico ruim em pacientes com NSCLC, sugerindo seu papel como um biomarcador clínico (Hassanein *et al.*, 2013, 2015). Estudos indicam que SCL1A5 é acoplado funcionalmente com SCL7A5 para o intercâmbio de aminoácidos capazes de ativação de sinalização de mTOR, uma quinase reguladora de crescimento tumoral (Bhutia *et al.*, 2015). Entretanto, Cormerais *et al.* (2018) verificaram que SCL1A5 é capaz de promover o crescimento tumoral em células A549, independentemente de SCL7A5. A proteína SCL3A2 é uma chaperona indispensável para o recrutamento de SCL7A5 para a membrana plasmática. Outro tipo de acoplamento funcional entre transportadores de aminoácidos que pode ocorrer é entre SCL1A5 com SCL7A11, que atua no fornecimento de cisteínas para síntese celular de glutathiona (Bhutia *et al.*, 2015).

A molécula glutathiona apresenta diversos papéis celulares importantes, muitos dos quais contribuem com a quimiorresistência tumoral a CDDP. A glutathiona pode atuar como um cofator de MRP (*multidrug resistance protein*) facilitando o efluxo de CDDP. Também pode atuar como um protetor celular por manter o equilíbrio redox intracelular, através de sua função antioxidante. Além disso, essa molécula pode formar adutos com a CDDP, o que causa neutralização da droga (Traverso *et al.*, 2013; Cadoni *et al.*, 2017). De fato, o maior papel da glutathiona é a detoxificação de componentes endógenos, sendo que a formação de conjugados com glutathiona pode ser catalisado por

GSTs (Glutathione S-transferases) (Traverso *et al.*, 2013). No presente trabalho, identificamos a GSTP1 (também nomeada de GST- π) nas VEs das células estudadas, com maior abundância significativa em VEs de células RA-A549 em relação às VEs de células sensíveis (*fold change* de 1,9). Já foi demonstrado que GST- π está associada com o desenvolvimento de resistência a CDDP em células A549 (Zhang *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2018). Em células de câncer de mama resistentes a droga adriamicina, foi demonstrado que exossomos derivados dessas células apresentam alta expressão de GST- π e que esses exossomos podem ser internalizados pelas células sensíveis a droga. A internalização desses exossomos leva a indução de fenótipo de resistência, em conjunto com o aumento da expressão de GST- π . Assim, é provável que a proteína seja um fator responsável pela transferência de quimiorresistência (Yang *et al.*, 2017).

Com bases nessas evidências, sugerimos que proteínas transportadoras de aminoácidos em VEs de células resistentes a CDDP podem participar da transferência de quimiorresistência. Essas proteínas podem atuar no fluxo de aminoácidos, reforçando o crescimento e sobrevivência tumoral, consequentemente auxiliando no desenvolvimento de resistência a drogas. A disponibilidade de aminoácidos pode induzir a expressão de glutathione, que em conjunto de GSTs transferidas pelas VEs, pode contribuir com a resistência por inibir a ação da CDDP. Aliado a isso, não podemos descartar a possibilidade de transferência concomitante de aminoácidos por VEs para células sensíveis que possam assim ampliar e reforçar os processos de crescimento e quimiorresistência tumoral.

3.4.3.5 Modulação do metabolismo energético de açúcares

Muitas enzimas da via glicolítica foram identificadas nas nossas amostras de VEs, como GPI (sem diferença significativa entre as amostras), alfa-enolase e

ALDH3A1 (exclusivas de VEs oriundas de células A549), GAPH, piruvato quinase, G6PD e PGK1 (com maior abundância em VEs secretadas por células A549, em comparação às VEs de RA-A549). Em VEs isoladas de células RA-A549, identificamos exclusivamente proteínas ligadas ao metabolismo de açúcares, como um transportador de glicose, GLUT1 (SLC2A1), e a enzima lactato desidrogenase cadeia B (LDHB). Além disso, identificamos com maior abundância nessas VEs a enzima lactato desidrogenase cadeia A (LDHA) (*fold change* de 5,3 em relação às VEs isoladas de células A549 sensíveis a CDDP).

GLUT-1 é um importante transportador que medeia o influxo de glicose para as células. O silenciamento de GLUT-1 em células de câncer de pescoço e cabeça sensibiliza as mesmas aos efeitos do tratamento com CDDP. Essa sensibilidade ocorre tanto nas condições de hipóxia quanto de normóxia (níveis de O₂ normais), assim como ocorre uma inibição de influxo de glicose e crescimento celular, além do aumento de apoptose (Wang *et al.*, 2013).

A proteína LDHA possui função de converter piruvato em lactato, cujas consequências são o aumento da concentração de lactato celular e, posterior, eliminação desse metabólito da célula. Por sua vez, a LDHB apresenta função de mediar a internalização de lactato e sua posterior conversão em piruvato (Semenza, 2013). A presença dessas duas enzimas em VEs secretadas por células RA-A549 culminou no enriquecimento do termo GO denominado *processo metabólico de lactato*, além como na função molecular de *atividade da L-lactato desidrogenase* (**Tabela complementar 7 e Figura 16**). Aliado a isso, identificamos nas mesmas VEs a proteína CD147, que atua como uma proteína auxiliar e indispensável para o transporte de lactato (Schneiderhan *et al.*, 2009).

Uma das características mais marcantes em células cancerígenas é o “efeito Warburg”. Esse efeito se baseia na reprogramação metabólica das células tumorais, ocorrendo assim uma utilização maior da glicólise do que a fosforilação oxidativa, mesmo sob condições aeróbicas, com um aumento de consumo de glicose e produção de lactato. Aliado a isso, esse efeito pode promover diferentes características ligadas a quimiorresistência tumoral, como aumento de efluxo de drogas, reparo de dano ao DNA e evasão da apoptose (Bhattacharya *et al.*, 2016; Icard *et al.*, 2018). Essas informações da literatura em conjunto dos nossos dados sugerem que as VEs secretadas por células resistentes a CDDP apresentam o fenótipo metabólico relacionado ao efeito Warburg.

VEs derivadas de células epiteliais de próstata apresentam um número expressivo de enzimas glicolíticas, assim como diferentes isoformas de GLUT. Essas enzimas contidas nessas vesículas apresentam atividade metabólica de produção de ATP (Ronquist *et al.*, 2013). Exossomos de células de câncer de próstata apresentam muitas enzimas glicolíticas, são enriquecidos com GLUT-1 e CD147, e capazes de formar ATP. Além disso, essas VEs produzem um nível de ATP maior, em comparação às VEs de células seminais normais, devido a sua menor atividade ATPase. Aliado a isso, a produção de ATP por essas VEs é necessária para a internalização das mesmas pelas células receptoras, indicando assim uma possível função do fluxo glicolítico nas VEs (Ronquist *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2016) demonstrou que exossomos derivados de fibroblastos associados a câncer são capazes de inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial, o que resulta no aumento da glicólise e secreção de lactato em células tumorais. Os autores ainda verificaram que as VEs continham diversos metabólitos (como lactato e piruvato) que podem ser utilizados pelas células tumorais para seu metabolismo e crescimento. Lopes-Rodrigues *et al.* (2017) demonstraram que VEs oriundas de células NSCLC com fenótipo MDR (*multidrug resistance*) são capazes de

transferir o perfil metabólico da célula de origem para células sensíveis a droga. Os autores observaram um aumento da glicólise e da capacidade glicolítica nas células que internalizaram as VEs.

Portanto, VEs podem ter o papel de modular o metabolismo energético de açúcares das células receptoras, assim como podem ser estruturas com atividades catalíticas associadas a produção de energia. Essa modulação pode estar associada ao efeito Warburg, que, por sua vez, atuando nas células tumorais sensíveis a droga, pode então ser um dos fatores indutores da quimiorresistência a CDDP.

3.4.3.6 Regulação proteolítica por sistema ubiquitina-proteassomo

Na análise proteômica, foi identificado um número expressivo de subunidades componentes do proteassomo 26S, um complexo de múltiplas proteínas envolvido na regulação da degradação de proteínas ubiquitinadas (Bedford *et al.*, 2010). Ao todo, foram identificadas 10 proteínas (PSMA4, PSMA7, PSMB3, PSMC1, PSMC3, PSMC5, PSMC6, PSMD11, PSMD12, PSMD14) e 3 proteínas (PSMA1, PSMB2, PSMC4) exclusivamente em VEs de células A549 e de células resistentes a CDDP, respectivamente. Logo, a maior diversidade dessa classe de proteínas nas VEs de células sensíveis refletiu no enriquecimento funcional do processo biológico *regulação da ubiquitinação proteica* (**Figura 17 e Tabela suplementar 2**). Dados celulares sugerem fortemente que a atividade de proteassomo é essencial para proliferação e desenvolvimento de quimiorresistência tumoral (Chen & Ping Dou, 2010; Matsunaga *et al.*, 2014). Entretanto, como verificamos uma maior presença de proteínas do complexo proteassômico em VEs de células sensíveis a CDDP, nossos dados indicam que esse conjunto proteico possa ter um papel contrário ao apresentado a nível celular em relação à quimiorresistência.

O proteassomo pode ser exportado por meio de VEs de linfócitos T e a dissolução da membrana das VEs pode liberar o proteassomo proteolítico ativamente no meio extracelular (Bochmann *et al.*, 2014). Kulichkova *et al.* (2017) demonstraram que diferentes células tumorais liberam proteassomo extracelular para o meio de cultura, os quais apresentam atividades tripsina- e caspase-*like*. Embora o mecanismo de liberação de proteassomas extracelulares seja desconhecido, os autores discutem a possibilidade do mesmo ocorrer por meio de VEs.

Estudos sugerem o uso de proteínas de proteassomo extracelular como um biomarcador de prognóstico de câncer, devido à sua elevada expressão no sangue de pacientes com tumores (Henry *et al.*, 2010; Heubner *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2011; de Martino *et al.*, 2012). Porém, são escassos os estudos demonstrando as possíveis funções de proteassomo extracelular.

Dianzani *et al.* (2017) demonstraram que proteassomo extracelular pode atuar no processamento de osteopontina, glicoproteína associada a diferentes papéis em células tumorais, inclusive em células de NSCLC (Štemberger *et al.*, 2014). O processamento de osteopontina por proteassomos extracelulares gera fragmentos quimiotáticos ativos em células endoteliais, linfócitos e monócitos, regulando a migração dessas células. Ainda, demonstrou-se que uma pequena porção de proteassomo de soro é estocada em VEs, logo a maior parte estava livre no espaço extracelular. Porém, os autores não descartam a hipótese do proteassomo ser liberado rapidamente de VEs de vida curta.

Wu *et al.* (2017) demonstraram que um baixo nível de uma proteína F-box – componente de um complexo de ligases de ubiquitina, cuja função é a ubiquitinação dependente de fosforilação – contribui, em células A549, com o aumento de CD147 e, portanto, com a resistência a CDDP. Assim, a regulação negativa do processo de

degradação proteica por ubiquitinação de CD147 pode contribuir com a quimiorresistência. A proteína CD147 foi identificada exclusivamente em VEs de RA-A549, o que sugere que CD147 pode ser um alvo de degradação via sistema ubiquitina-proteassomo apenas nas células sensíveis.

Embora limitados, há estudos indicando que proteassomos de VEs podem ser funcionalmente ativos. A degradação de proteínas ubiquitinadas pelos proteassomos contidos nas vesículas secretadas pelas células A549 pode representar um mecanismo associado a sensibilidade dessas células ao quimioterápico. Por outro lado, a não degradação de determinadas proteínas-alvo nas células resistentes devido à redução de proteassomos nas VEs liberadas por essas células pode ser uma característica que contribui para a quimiorresistência.

3.4.3.7 Transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT)

A EMT é reportada como uma das características que acompanha a formação de resistência a CDDP em diversos tipos de tumores (Wang *et al.*, 2014; Piskareva *et al.*, 2015; Boac *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016a; Feng *et al.*, 2017; Fortunato, 2017; Ge *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017) No processo de EMT ocorre a perda de polaridade basal-apical e das junções celulares, reorganização do citoesqueleto e regulação de vias de sinalização envolvidas com a mobilidade e formato das células epiteliais. Por efeito, ocorrem mudanças de morfologia fibroblastos-*like* e modificações nas características fisiológicas, como migração, mobilidade e resistência a apoptose (Brozovic, 2017). Em nossas análises, foi possível observar uma mudança de morfologia indicativa de processo EMT-*like* nas células RA-A549.

Evidências mostram que VEs derivadas de células cancerígenas podem ser fatores indutores do desenvolvimento da EMT (Vella, 2014; Blackwell *et al.*, 2017). Lobb *et al.* (2017) desenvolveram uma linhagem celular de epitélio bronquial humano com fenótipo EMT, com intuito de estudar quimiorresistência em células de NSCLC. Os pesquisadores demonstraram que VEs derivadas dessa linhagem podem transferir a resistência à CDDP e induzir o aumento de fatores de transcrição de EMT às células receptoras.

Estudos mostram níveis de expressão diferenciados de proteínas em VEs tumorais que possam estar ligadas ao processo de EMT (Garnier *et al.*, 2013; Tauro *et al.*, 2013). Cabe destacar o papel da ADAM10, proteína de remodelagem da MEC já discutida neste trabalho por ter sido detectada exclusivamente em vesículas de RA-A549 e pelo seu provável envolvimento no processo de resistência a CDDP (Deng *et al.*, 2017). Essa proteína também está relacionada a EMT, uma vez que foi constatado que a expressão elevada de ADAM10 pode reforçar a transição tecidual em questão (You *et al.*, 2015).

Outra proteína interessante é a nidogenina-2, a qual atua em conjunto de perlecan como ligante proteico em redes de laminina e colágeno da membrana basal (Harisi & Jeney, 2015; Robertson, 2016). Nidogenina-1, uma proteína da mesma família e com similaridade estrutural a nidogenina-2 (Fox *et al.*, 1991), apresenta relação com quimiorresistência celular. Um alto nível de nidogenina-1 foi correlacionado com uma sobrevivência curta, estágios avançados da doença e o uso da quimioterapia neoadjuvante baseada em platina em pacientes com câncer de ovário (Li *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017). A alta expressão de nidogenina-1 em células tumorais de ovário promove o aumento de mobilidade, invasão e resistência celular a CDDP via EMT (Zhou *et al.*, 2017). Portanto, essas proteínas presentes em vesículas de RA-A549

podem desempenhar a função de ativar vias de sinalização correspondentes ao desenvolvimento de EMT.

Como já mencionado, a redução de proteínas ligadas a esse sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma em VEs de RA-A549 pode ser um fator atuante no desenvolvimento de fenótipo resistente. Aliado a essas informações, o sistema ubiquitina-proteassoma é um regulador de fatores de transcrição associados à EMT, sendo que a redução da atividade proteassoma 26S promove essa transição tecidual (Voutsadakis, 2012; Banno *et al.*, 2016). Portanto, a presença reduzida de proteínas proteassomais em VEs de células resistentes a CDDP pode estar relacionada com a formação de características típicas de EMT.

Com base nas evidências das nossas análises de microscopia e proteômica, juntamente dos dados disponíveis em publicações científicas, é provável que a formação de EMT seja um forte aliado ao desenvolvimento de quimiorresistência a CDDP nas linhagens celulares estudadas. Além disso, os dados sugerem que essa modificação celular pode ser transferida entre as células por meio de VEs, logo a transferência intercelular de fenótipo do processo EMT pode ser concomitante à de quimiorresistência.

3.4.3.8 Regulação negativa da transição de fase do ciclo celular

As análises de termos de GO revelaram o enriquecimento do processo biológico *regulação negativa da transição de fase do ciclo celular* apenas nas VEs isoladas de células A549 sensíveis a CDDP (**Figura 17**). Horibe *et al.* (2015) mostraram que células A549 com resistência a CDDP podem ter uma resposta de escape à parada na fase G2/M, após o dano de DNA induzido pela droga. Sarin *et al.* (2017) também observaram a diminuição da pausa de fase G2/M em células A549 resistentes a CDDP

após a indução ao dano de DNA com esse quimioterápico, o que foi acompanhado da redução de apoptose.

Microvesículas liberadas por células tumorais de coloretal são capazes de modular o ciclo celular de células endoteliais, estimulando a proliferação dessas células (Hong *et al.*, 2009). Células de câncer de próstata secretam exossomos que modulam a expressão de proteínas associadas ao ciclo celular e influenciam na proliferação celular (Gabriel *et al.*, 2013). Exossomos secretados por células de câncer de mama com resistência a dois tipos de drogas podem transmitir a quimiorresistência a células sensíveis. Aliado a isso, foi verificada uma modulação da distribuição do ciclo celular, como o aumento da fase G1/G2 e redução da fase S, em conjunto da redução apoptótica (Chen *et al.*, 2014a). A incubação das células A549 com exossomos oriundos de células resistentes a CDDP é capaz de induzir o aumento da fase G1 e a diminuição da fase S. Enquanto, a incubação das células A549 com seus próprios exossomos, leva ao aumento da fase S (Qin *et al.*, 2017a). Portanto, esses trabalhos nos indicam que VEs podem modular o processo de divisão celular em células recipientes.

Como proteínas proteassômicas são reguladoras de fatores associados ao ciclo celular (Donzelli & Draetta, 2003; Johnson, 2015; Younes *et al.*, 2017), a maior presença dessas proteínas em VEs de células A549 sugere a sua participação em uma possível indução à parada da divisão das células recipientes. A redução de proteínas de proteassoma em VEs de células resistentes a CDDP pode ser importante para impedir essa parada, ou seja, para induzir a progressão tumoral. Logo, tal relação pode ser imprescindível para o desenvolvimento de resistência nas células que internalizarem as VEs, uma vez que acaba sendo um mecanismo que reduz a apoptose.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho investigou a transferência de resistência a CDDP entre linhagens humanas de adenocarcinoma de pulmão A549 sensíveis e resistentes a droga. Células resistentes a CDDP (RA-A549) foram estabelecidas a partir da exposição de células A549 parentais a concentrações crescentes da droga. Após, nós demonstramos a transferência de quimiorresistência da linhagem RA-A549 para as células sensíveis através de cocultivo em sistema *transwell*. Considerando que muitos fatores moleculares podem ter influenciado nas modificações que tornaram as células A549 resistentes a CDDP, nós mostramos a possibilidade de internalização de VEs entre as linhagens estudadas sob cocultivo. Devido às evidências relatadas na literatura científica de que VEs desempenham um papel muito importante como mecanismo de transferência intercelular de quimiorresistência, nós isolamos e caracterizamos as vesículas secretadas pelas células A549 sensíveis e resistentes a CDDP e analisamos o conteúdo proteico dessas estruturas. Essa análise proteica foi de suma importância, pois dados proteicos absolutos de VEs de células A549 eram desconhecidos. Além disso, por meio desses dados, conseguimos inferir prováveis processos biológicos envolvidos com a transferência de quimiorresistência intercelular a CDDP em células de adenocarcinoma de pulmão.

No geral, os processos discutidos neste trabalho são relevantes para a transferência intercelular de quimiorresistência a CDDP por meio de VEs, indicando mecanismos que: a) promovem um microambiente favorável para a proliferação, adesão e agregação celular, envolvido na construção de barreiras moleculares que impeçam o fluxo da droga; b) induzem processos de invasão e migração celular, o que leva a progressão tumoral e preparação de sítios pré-tumorais; c) desempenham funções relacionadas à evasão e controle do processo de apoptose e autofagia; d) modulam a

ativação e inibição de vias de sinalização do sistema imunológico e da coagulação, com o intuito de evadir os danos celulares de combate do sistema de defesa e induzir a progressão, angiogênese e migração tumoral; e) regulam a transição de fases do ciclo celular (refletindo em proliferação celular), autorenovação, o reparo de DNA e o desenvolvimento de células-tronco; f) ajudam as células se adaptarem a um ambiente desfavorável, com baixa concentração de nutrientes, regulando o metabolismo energético, com o intuito de sobrevivência e crescimento tumoral; g) protegem as células por facilitar o efluxo ou a neutralização da droga; h) regulam a degradação de proteínas importantes para o desenvolvimento da quimiorresistência; i) reorganizam a estrutura e formato das células tumorais, reduzindo os efeitos citotóxicos da droga.

A identificação e o entendimento dos papéis de proteínas contidas em VEs de células resistentes a CDDP se somam ao quebra-cabeça dos processos biológicos ligados a formação de resistência tumoral. A identificação e compreensão das funções proteicas em vesículas de células sensíveis ajudaram a entender melhor, não somente a manutenção de sensibilidade a droga CDDP, mas também os mecanismos, cuja regulação deve estar reduzida ou anulada em células resistentes. As VEs podem desempenhar o papel geral de regular a dinâmica molecular nas células tumorais, atuando de fato na transferência de resistência a droga CDDP em células de adenocarcinoma de pulmão.

5. PERSPECTIVAS

Com o propósito de validar e confirmar os resultados analisados, assim como ampliar o entendimento dos dados e do problema proposto, este trabalho tem como perspectivas:

- Análise da expressão das proteínas identificadas como reguladas positivamente por *Western blot* e RT-qPCR;
- Análise da regulação das vias de sinalização discutidas com a utilização de células geneticamente modificadas com mutações para os genes das proteínas associadas a essas vias;
- Identificação e análise proteômica do secretoma das células A549 em cocultivo celular;
- Verificação da transferência de resistência a cisplatina em células com secreção de vesículas inibida;
- Identificação e análise comparativa de miRNAs de vesículas originadas das células A549 e RA-A549.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, I. W. et al. Cisplatin based therapy: The role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2018.

ACS. **Non-small cell lung cancer detailed guide**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 5, p. 728–734, 2006.

ANDREU, Z.; YÁÑEZ-MÓ, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–12, 2014.

ARENDET, B. K. et al. Multiple myeloma cell-derived microvesicles are enriched in CD147 expression and enhance tumor cell proliferation. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5686–5699, 2014.

ARRIAGADA, R. et al. Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 4, p. 351–360, 2004.

AZMI, A. S.; BAO, B.; SARKAR, F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, p. 623–642, 2013.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. Initiating cellular stress responses. **Cell**, v. 118, n. 1, p. 9–17, 2004.

BANNO, A. et al. Downregulation of 26S proteasome catalytic activity promotes epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, 2016.

BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.

BEBAWY, M. et al. Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 23, n. 9, p. 1643–1649, 2009.

BEBELMAN, M. P. et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, 2018.

BECKER, A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell to cell mediators of metastasis. **Cancer Cell**, v. 30, n. 6, p. 836–848, 2017.

BECKER, M. et al. High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas. **Tumor Biology**, v. 35, n. 2, p. 1233–1238, 2014.

BEDFORD, L. et al. Assembly, Structure and Function of the 26S proteasome. **Trends cell biology**, v. 20, n. 7, p. 391–401, 2010.

BERGHMANS, T.; PAESMANS, M.; SCULIER, J. Prognostic factors in stage III non-small cell lung cancer: a review of conventional, metabolic and new biological variables. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 3, n. 3, p. 127–138, 2011.

BÉRUBÉ, M. et al. Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin. **International journal of oncology**, v. 26, n. 2, p. 405–413, 2005.

BHATTACHARYA, B.; MOHD OMAR, M. F.; SOONG, R. The Warburg effect and drug resistance. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 6, p. 970–979, 2016.

BHUTIA, Y. D. et al. Amino acid transporters in cancer and their relevance to “glutamine addiction”: Novel Targets for the design of a new class of anticancer drugs. **Cancer Research**, v. 75, n. 9, p. 1782–1788, 2015.

BLACKWELL, R. H.; FOREMAN, K. E.; GUPTA, G. N. The role of cancer-derived exosomes in tumorigenicity & epithelial-to-mesenchymal transition. **Cancers**, v. 9, n. 8, p. 12–17, 2017.

BOAC, B. M. et al. Micro-RNAs associated with the evolution of ovarian cancer cisplatin resistance. **Gynecologic Oncology**, v. 140, n. 2, p. 259–263, 2016.

BOCHMANN, I. et al. T lymphocytes export proteasomes by way of microparticles: A possible mechanism for generation of extracellular proteasomes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 59–68, 2014.

BOYLE, P.; LEWIN, B. World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer, France, 2008.

- BREIER, A. et al. New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, p. 159–170, 2013.
- BROZOVIC, A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 605–619, 2017.
- CADONI, E. et al. Competitive reactions among glutathione, cisplatin and copper-phenanthroline complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 173, n. February, p. 126–133, 2017.
- CAMPANELLA, C. et al. Exosomal Heat Shock Proteins as New Players in Tumour Cell-to-Cell Communication. **Journal of Circulating Biomarkers**, v. 3, p. 4, 2014.
- CARMO, C. R. et al. A novel requirement for Janus Kinases as mediators of drug resistance induced by fibroblast growth factor-2 in human cancer cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- CASTELLS, M. et al. Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 9545–9571, 2012.
- CHABNER, B. A. Barnett Rosenberg : In Memoriam (1924 – 2009). **Cancer Research**, v. 70, n. 1, 2010.
- CHEN, D.; PING DOU, Q. The Ubiquitin-Proteasome System as a Prospective Molecular Target for Cancer Treatment and Prevention. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 6, p. 459–470, 2010.
- CHEN, Q.-Y. et al. miR-206 regulates cisplatin resistance and EMT in human lung adenocarcinoma cells partly by targeting MET. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24510–26, 2016.
- CHEN, W. X. et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of MicroRNAs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014a.
- CHEN, Z. et al. Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535–546, 2014b.
- CHOI, D. et al. Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, 2012.

- CHOI, D. Y. et al. Extracellular vesicles shed from gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer regulate the tumor microenvironment. **Proteomics**, v. 14, n. 16, p. 1845–1856, 2014.
- CHRISTIANSON, H. C. et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17380–17385, 2013.
- CHU, Y. et al. Calsyntenin-1, clusterin and neutrophil gelatinase-associated lipocalin are candidate serological biomarkers for lung adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 64, p. 107964–107976, 2017.
- CLAYTON, A. et al. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 522–531, 2003.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 2014.
- COOPER, J. R. et al. Long term culture of the a549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II Pneumocyte phenotype. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–20, 2016.
- CORMERAIS, Y. et al. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 8, p. 2877–2887, 2018.
- CORRALES, L. et al. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4674–4683, 2012.
- CZERNEK, L.; DÜCHLER, M. Functions of Cancer-Derived Extracellular Vesicles in Immunosuppression. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 4, p. 311–323, 2017.
- DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DATTA, S.; PIERCE, M.; DATTA, M. W. Perlecan signaling: Helping hedgehog stimulate prostate cancer growth. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, n. 11, p. 1855–1861, 2006.

DE JONG, O. G. et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell- derived exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3078, p. 1–12, 2012.

DE MARTINO, M. et al. Serum 20S proteasome is elevated in patients with renal cell carcinoma and associated with poor prognosis. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 5, p. 904–908, 2012.

DE SOUZA, P. S. et al. Microparticles induce multifactorial resistance through oncogenic pathways independently of cancer cell type. **Cancer Science**, v. 106, n. 1, p. 60–68, 2015.

DENG, F.; YANG, Z.; SUN, C. The role of Notch1 genes in lung cancer A594 cells and the impact on chemosensitivity. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 2659–2664, 2017.

DIANZANI, C. et al. Extracellular proteasome-osteopontin circuit regulates cell migration with implications in multiple sclerosis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–12, 2017.

DONNEM, T. et al. Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 3, n. 9, p. 963–970, 2008.

DONZELLI, M.; DRAETTA, G. F. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. **EMBO Reports**, v. 4, n. 7, p. 671–677, 2003.

DUAN, S. et al. IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27651–27660, 2015.

EINHORN, E. The scaffolding protein RACK1: multiple roles in human cancer. **Biosciences Master Reviews**, n. Nov 2013, p. 1–9, 2013.

EL-BADAWY, A. et al. Cancer cell-soluble factors reprogram mesenchymal stromal cells to slow cycling, chemoresistant cells with a more stem-like state. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2017.

- ENOIU, M.; JIRICNY, J.; SCHÄRER, O. D. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 8953–8964, 2012.
- FADEJEVA, I.; OLSCHEWSKI, H.; HRZENJAK, A. MicroRNAs as regulators of cisplatin-resistance in non-small cell lung carcinomas. v. 8, n. 70, p. 115754–115773, 2017.
- FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 2, p. 223–233, 2013.
- FENG, S. et al. NEDD4 is involved in acquisition of epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. **Cell Cycle**, v. 16, n. 9, p. 869–878, 2017.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 386, 2015.
- FISHELSON, Z. et al. Obstacles to cancer immunotherapy: Expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 2-4, p. 109–123, 2003.
- FORTUNATO, A. The role of hERG1 ion channels in epithelial-mesenchymal transition and the capacity of riluzole to reduce cisplatin resistance in colorectal cancer cells. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 4, p. 367–378, 2017.
- FOSBRINK, M.; NICULESCU, F.; RUS, H. The role of C5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. **Immunologic Research**, v. 31, n. 1, p. 37–46, 2005.
- FOX, J. W. et al. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. **The EMBO journal**, v. 10, n. 11, p. 3137–46, 1991.
- FRYDRYCHOWICZ, M. et al. Exosomes - Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 1, p. 2–10, 2015.

FU, L. et al. ADAM10 regulates proliferation, invasion, and chemoresistance of bladder cancer cells. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 9263–9268, 2014.

FUJITA, Y.; YOSHIOKA, Y.; OCHIYA, T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. **Cancer Science**, v. 107, n. 4, p. 385–390, 2016.

GABRIEL, K. et al. Regulation of the Tumor Suppressor PTEN through Exosomes: A Diagnostic Potential for Prostate Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

GARNIER, D. et al. Qualitative changes in the proteome of extracellular vesicles accompanying cancer cell transition to mesenchymal state. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 17, p. 2747–2757, 2013.

GBD 2015 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016.

GE, L. et al. TAZ overexpression is associated with epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant gastric cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 1, p. 307–315, 2017.

GIALLOMBARDO, M. et al. Exosome-mediated drug resistance in cancer: The near future is here. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 8, n. 5, p. 320–322, 2016.

GLOBOCAN. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Default.aspx](http://globocan.iarc.fr/Default.aspx?nhhttp://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)\nhhttp://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 15 mar. 2015.

GREEN, T. M. et al. Breast cancer-derived extracellular vesicles: Characterization and contribution to the metastatic phenotype. **BioMed Research International**, 2015.

GROUP, N. M. C. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. **The Lancet**, v. 383, n. 9928, p. 1561–1571, 2014.

GUERRA, M. R. et al. Magnitude e variação da carga da mortalidade por câncer no Brasil e Unidades da Federação, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. suppl 1, p. 102–115, 2017.

GUO, J. et al. ADAM10 overexpression in human non-small cell lung cancer correlates with cell migration and invasion through the activation of the Notch1 signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 28, n. 5, p. 1709–1718, 2012.

GUSTAFSON, D.; VEITCH, S.; FISH, J. E. Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. November, p. 1–12, 2017.

HAKULINEN, J. et al. Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 5, p. 1211–1218, 2008.

HARISI, R.; JENEY, A. Extracellular matrix as target for antitumor therapy. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 1387–1398, 2015.

HASSANEIN, M. et al. SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 3, p. 560–570, 2013.

HASSANEIN, M. et al. Targeting SLC1A5-mediated glutamine dependence in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1587–1597, 2015.

HENRY, L. et al. Diagnostic value and prognostic significance of plasmatic proteasome level in patients with melanoma. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 12, p. 1054–1059, 2010.

HEUBNER, M. et al. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 120, n. 2, p. 233–238, 2011.

HIDA, T. et al. Chemosensitivity and Radiosensitivity of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Studied by a Newly Developed (MTT) Hybrid Assay Chemosensitivity and Radiosensitivity of Small Cell Lung Cancer Cell Lines. v. 16, p. 4785–4790, 1989.

HISCOX, S. et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of β -catenin phosphorylation. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 2, p. 290–301, 2006.

HOFFMANN, O. et al. Circulating 20S proteasome in patients with non-metastasized breast cancer. **Anticancer Research**, v. 31, n. 6, p. 2197–2201, 2011.

HONG, B. S. et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–13, 2009.

HORIBE, S. et al. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. **Life Sciences**, v. 124, p. 31–40, 2015.

HORN, L. et al. Cancer of the Lung: Non – Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer. In: NIEDERHUBER, J. et al. (Eds.). . **Abeloff's Clinical Oncology**. Fifth Edit ed.[s.l.] Elsevier Inc., p. 1143–1192.e14, 2013.

HORN, L.; PAO, W.; JOHNSON, D. H. Chapter 89. Neoplasms of the Lung | Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical. In: **Principles of INTERNAL MEDICINE**, 2017.

HOYT, D. G. et al. Integrin Activation Suppresses Etoposide-induced DNA Strand Breakage in Cultured Murine Tumor-derived Endothelial Cells. **Cancer Research**, v. 58, n. 18, p. 4146–4150, 1996.

HUANG, D. et al. Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.

HURWITZ, S. N. et al. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 86999–87015, 2016.

ICARD, P. et al. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? **Drug Resistance Updates**, v. 38, p. 1–11, 2018.

INCA. **Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 01 Ago. 2018.

JAISWAL, R. et al. Breast Cancer-Derived Microparticles Display Tissue Selectivity in the Transfer of Resistance Proteins to Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

JAKOBSEN, K. R. et al. Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma. **J Extracell Vesicles**, v. 4, p. 26659, 2015.

JEMAL, A. et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, p. 1893–1907, 2010.

JEN, J.; WANG, Y.-C. Zinc finger proteins in cancer progression. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 53, 2016.

JI, T. et al. Designing Liposomes to Suppress Extracellular Matrix Expression to Enhance Drug Penetration and Pancreatic Tumor Therapy. **ACS Nano**, v. 11, n. 9, p. 8668–8678, 2017.

JODRELL, D. I. et al. Relationships between carboplatin exposure and tumor response and toxicity in patients with ovarian cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 4, p. 520–528, 1992.

JOHNSON, D. E. The ubiquitin-proteasome system: Opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 2015.

JONES, V. S. et al. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1865, n. 2, p. 255–265, 2016.

JORFI, S.; INAL, J. M. The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance. **Biochemical Society transactions**, v. 41, p. 293–8, 2013.

JULIACHS, M. et al. The PDGFR β -AKT pathway contributes to CDDP-acquired resistance in testicular germ cell tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 3, p. 658–667, 2014.

JUNJIE, S. X.; CRETOIU. **Exosomes in Cardiovascular Diseases: Biomarkers, Pathological and Therapeutic Effects**. 1. ed. [s.l.] Springer Singapore, 2017.

KAHLERT, C.; KALLURI, R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 4, p. 431–437, 2013.

KAJIYAMA, H. et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 277–283, 2007.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. Discovery of double-stranded genomic DNA in circulating exosomes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, n. 1, p. 275–280, 2016.

KASAHARA, K. et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. **Cancer research**, v. 51, n. 12, p. 3237–3242, 1991.

KAVANAGH, E. L. et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. **Oncogenesis**, v. 6, n. 10, p. e388, 2017.

KAWAI, H. et al. Characterization of non-small-cell lung cancer cell lines established before and after chemotherapy. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 35, n. 3, p. 305–14, 2002.

KAWAKAMI, K. et al. Integrin $\beta 4$ and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance. **International Journal of Oncology**, v. 47, n. 1, p. 384–390, 2015.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, p. 573–584, 2007.

KHARAZIHA, P. et al. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21740–21754, 2015.

KILPIN, K. J.; DYSON, P. J. Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. **Chemical Science**, v. 4, n. 4, p. 1410, 2013.

KLEIN-SCORY, S. et al. New insights in the composition of extracellular vesicles from pancreatic cancer cells : implications for biomarkers and functions. p. 1–18, 2014.

KOLEV, M.; TOWNER, L.; DONEV, R. Complement in cancer and cancer immunotherapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 6, p. 407–419, 2011.

KONOSHENKO, M. Y. et al. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

- KOWAL, J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. E968–E977, 2016.
- KUANG, P. et al. Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. **Lung Cancer**, v. 77, n. 2, p. 427–432, 2012.
- KUCHARZEWSKA, P. et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 18, p. 7312–7317, 2013.
- KULICHKOVA, V. A et al. Proteomic analysis of affinity-purified extracellular proteasomes reveals exclusively 20S complexes. **Oncotarget**, v. 8, n. 60, p. 102134–102149, 2017.
- LAN, D. et al. Exogenous glutathione contributes to cisplatin resistance in lung cancer A549 cells. **American Journal of translational Research**, v. 10, n. 5, p. 1295–1309, 2018.
- LEE, S. O. et al. IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 6626–6638, 2015.
- LI, A. et al. Exosomal proteins as potential markers of tumor diagnosis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 175, 2017a.
- LI, J. et al. The functional role of exosome microRNAs in lung cancer. *Central European Journal of Biology*, v. 12, n. 1, p. 223–227, 2017b.
- LI, L. et al. Nidogen-1: A candidate biomarker for ovarian serous cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 45, n. 2, p. 176–182, 2015.
- LI, Q.; SHU, Y. Role of solute carriers in response to anticancer drugs. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 1, p. 15, 2014.
- LOBB, R. J. et al. Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 3, p. 614–620, 2017.

- LOPATINA, T. et al. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 12, n. 1, p. 26, 2014.
- LOPES-RODRIGUES, V. et al. Multidrug resistant tumour cells shed more microvesicle-like EVs and less exosomes than their drug-sensitive counterpart cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 618–627, 2016.
- LOPES-RODRIGUES, V. et al. Identification of the metabolic alterations associated with the multidrug resistant phenotype in cancer and their intercellular transfer mediated by extracellular vesicles. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–17, 2017.
- LU, J. et al. Exosomal tetraspanins mediate cancer metastasis by altering host microenvironment. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 62803–62815, 2017.
- LV, M. M. et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. **Tumor Biology**, 2014.
- LYNCH, C.; PANAGOPOULOU, M.; GREGORY, C. D. Extracellular vesicles arising from apoptotic cells in tumors: Roles in cancer pathogenesis and potential clinical applications. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–8, 2017.
- MA, G. et al. SCLU regulates cisplatin chemosensitivity of lung cancer cells in vivo. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2015.
- MA, X. et al. Essential role for TrpC5-containing extracellular vesicles in breast cancer with chemotherapeutic resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 2–7, 2014.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.
- MALTA, D. C. et al. Trends in corrected lung cancer mortality rates in Brazil and regions. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 0, p. 1–9, 2016.
- MANISH, S. et al. Drug resistance in lung cancer. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, p. 23–36, 2010.

MATSUNAGA, T. et al. Nitric oxide confers cisplatin resistance in human lung cancer cells through upregulation of aldo-keto reductase 1B10 and proteasome. **Free Radical Research**, v. 48, n. 11, p. 1371–1385, 2014.

MCDERMOTT, M. et al. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 2014.

MCDONALD, J. F.; NELSESTUEN, G. L. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: Characterization of its impact on C9 polymerization. **Biochemistry**, v. 36, n. 24, p. 7464–7473, 1997.

MELNIKOV, S. V. et al. Insights into RNA binding by the anticancer drug cisplatin from the crystal structure of cisplatin-modified ribosome. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 10, p. 4978–4987, 2016.

MENCK, K. et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 143–153, 2015.

MESSORI, L.; MERLINO, A. Cisplatin binding to proteins: Molecular structure of the ribonuclease A adduct. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3929–3931, 2014.

MILLIMAGGI, D. et al. Tumor Vesicle—Associated CD147 Modulates the Angiogenic Capability of Endothelial Cells. **Neoplasia**, v. 9, n. 4, p. 349–357, 2007.

MIYAKE, H. et al. Expression of basic fibroblast growth factor is associated with resistance to cisplatin in a human bladder cancer cell line. **Cancer letters**, v. 123, n. 2, p. 121–6, 1998.

MOLINA, J. R. et al. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 5, p. 584–594, 2008.

MUIZNIEKS, L. D.; KEELEY, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 7, p. 866–875, 2013.

NABESHIMA, K. et al. Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. **Pathology International**, v. 56, n. 7, p. 359–367, 2006.

NAWAZ, M. et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 12, p. 688–701, 2014.

NCI. **What you need to know about lung cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/publications/patient-education/wyntk_lung.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2015.

NESARGIKAR, P.; SPILLER, B.; CHAVEZ, R. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 2, n. 2, p. 103–111, 2012.

NETTI, P. A et al. Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. **Cancer Research**, v. 60, n. 9, p. 2497–2503, 2000.

O'LOGHLEN, A. Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, 2018.

OBENAU, A. C. . et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 368–372, 2015.

OKOUOYO, S. et al. Rescue of death receptor and mitochondrial apoptosis signaling in resistant human NSCLC in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 4, p. 580–587, 2004.

OZAKI, T. et al. Cisplatin Binding and Inactivation of Mitochondrial Glutamate Oxaloacetate Transaminase in Cisplatin-Induced Rat Nephrotoxicity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 8, p. 1645–1649, 2013.

PASQUIER, J. et al. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell P-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7374–7387, 2012.

PFISTER, D. G. et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 2, p. 330–353, 2004.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243–1253, 2014.

PIO, R.; AJONA, D.; LAMBRIS, J. D. Complement inhibition: a promising concept for cancer treatment. **Seminars in immunology**, v. 25, n. 1, p. 54–64, 2013.

PISKAREVA, O. et al. The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro. **Cancer Letters**, v. 364, n. 2, p. 142–155, 2015.

POKHAREL, D. et al. Proteome analysis of multidrug-resistant, breast cancer-derived microparticles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, p. 1–12, 2014.

PROVENCIO, M. et al. Inoperable stage III non-small cell lung cancer: Current treatment and role of vinorelbine. **Journal of Thoracic Disease**, v. 3, n. 3, p. 197–204, 2011.

PURUSHOTHAMAN, A. et al. Fibronectin on the surface of myeloma cell-derived exosomes mediates exosome-cell interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 4, p. 1652–1663, 2016.

QIN, X. et al. Cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal miR-100–5p-dependent manner. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3721–3733, 2017a.

QIN, X. et al. Comparative analysis of microRNA expression profiles between A549, A549/DDP and their respective exosomes. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 42125–42135, 2017b.

RAMMS, L. et al. Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18513–18518, 2013.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

REBILLARD, A. et al. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 16, p. 7865–7874, 2007.

REINMUTH, N. et al. Combined anti-PDGFR α and PDGFR β targeting in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1535–1544, 2009.

REIS, E. S. et al. Complement in cancer: Untangling an intricate relationship. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 5–18, 2018.

RHO, J. K. et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. **Lung Cancer**, v. 63, n. 2, p. 219–226, 2009.

RIVERA, M. P.; MEHTA, A. C.; WAHIDI, M. M. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 143, n. 5 SUPPL, 2013.

ROBERTSON, C. The extracellular matrix in breast cancer predicts prognosis through composition, splicing, and crosslinking. **Experimental Cell Research**, v. 343, n. 1, p. 73–81, 2016.

ROGERS, K. **The Components of Life: From Nucleic Acids to Carbohydrates**. 1^a ed. New York: Britannica Educational Publishing, 2011.

RONQUIST, K. G. et al. Human prostatesomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 6, p. 576–582, 2013.

RONQUIST, K. G. et al. Energy-requiring uptake of prostatesomes and PC3 cell-derived exosomes into non-malignant and malignant cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2016.

ROSANÒ, L. et al. Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 8, p. 2350–2360, 2011.

ROSE, M. C.; HUANG, R. S. Pharmacogenomics of Cisplatin Sensitivity in Non-small Cell Lung Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 12, n. 5, p. 198–209, 2014.

SAHNI, A. et al. Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 1, p. 176–183, 2008.

SALM, F. et al. RNA interference screening identifies a novel role for autocrine fibroblast growth factor signaling in neuroblastoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 32, n. 34, p. 3944–3953, 2013.

SANDFELD-PAULSEN, B. et al. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 10, p. 1595–1602, 2016.

SARIN, N. et al. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–26, 2017.

SARRAZIN, S.; LAMANNA, W. C.; ESKO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–33, 2011.

SAYGIN, C. et al. CD55 regulates self-renewal and cisplatin resistance in endometrioid tumors. **The Journal of Experimental Medicine**, 2017.

SCHAEFER, L. et al. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. **FEBS Journal**, v. 284, n. 1, p. 10–26, 2017.

SCHNEIDERHAN, W. et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. **Gut**, v. 58, n. 10, p. 1391–1398, 2009.

SEMENZA, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3664–3671, 2013.

SETHI, T. et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 662–668, 1999.

SHEN, D.-W. et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 706–21, 2012.

SHENG, L. et al. Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2720–2725, 2013.

SHIMODA, M. et al. Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 889–901, 2014.

SIDDIK, Z. H. BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF CISPLATIN RESISTANCE. In: ROSEN, S. T. (Ed.). . **Clinically relevant resistance in cancer chemotherapy**. [s.l: s.n.]. p. 390, 2002.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7265–7279, 2003.

SIDHU, S. S. et al. The microvesicle as a vehicle for EMMPRin in tumor-stromal interactions. **Oncogene**, v. 23, n. 4, p. 956–963, 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.

SIMPSON, R. J.; JENSEN, S. S.; LIM, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. **Proteomics**, v. 8, p. 4083–4099, 2008.

SIMPSON-HAIDARIS, P. J.; RYBARCZYK, B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 406–425, 2001.

SOEKMADJI, C. et al. Modulation of paracrine signaling by CD9 positive small extracellular vesicles mediates cellular growth of androgen deprived prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 52237–52255, 2017.

SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Melanoma exosomes: Messengers of metastasis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 853–854, 2012.

SONG, X. et al. Activation of hedgehog signaling and its association with cisplatin resistance in ovarian epithelial tumors. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5569–5576, 2018.

ŠTEMBERGER, C. et al. Osteopontin is associated with decreased apoptosis and α integrin expression in lung adenocarcinoma. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 1, p. 222–229, 2014.

STEWART, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 63, n. 1, p. 12–31, 2007.

STRAUSSMAN, R. et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 500–504, 2012.

SU, Z. et al. Autophagy inhibition impairs the epithelial-mesenchymal transition and enhances cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4147–4154, 2017.

SUCHORSKA, W. M.; LACH, M. S. The role of exosomes in tumor progression and metastasis (Review). **Oncology Reports**, v. 35, n. 3, p. 1237–1244, 2016.

SULLIVAN, R. et al. The emerging roles of extracellular vesicles as communication vehicles within the tumor microenvironment and beyond. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 1–11, 2017.

SUN, Y. et al. Identifying anti-cancer drug response related genes using an integrative analysis of transcriptomic and genomic variations with cell line-based drug perturbations. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, 2014.

TAKAHASHI, A. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–14, 2017.

TANNOCK, I. F. et al. Limited Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue: A Potential Cause of Resistance of Solid Tumors to Chemotherapy Limited Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue: A Potential Cause of Resistance of Solid Tumors to Chemotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, p. 878–884, 2002.

TAURO, B. J. et al. Oncogenic H-Ras Reprograms Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cell-derived Exosomal Proteins Following Epithelial-Mesenchymal Transition. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 8, p. 2148–2159, 2013.

TEGLA, C. A. et al. Membrane attack by complement: The assembly and biology of terminal complement complexes. **Immunologic Research**, v. 51, n. 1, p. 45–60, 2011.

TELLEZ-GABRIEL, M. et al. Tumour heterogeneity: The key advantages of single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

THAKUR, B. K. et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. **Cell Research**, v. 24, n. 6, p. 766–769, 2014.

- THAYANITHY, V. et al. A transwell assay that excludes exosomes for assessment of tunneling nanotube-mediated intercellular communication. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2017.
- THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. **Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]**, v. Chapter 3, p. 1–29, 2006.
- TICKNER, J. A et al. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 127, 2014.
- TRAVERSO, N. et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- TRÉDAN, O. et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441–1454, 2007.
- VAN DER POL, E. et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 676–705, 2012.
- VELLA, L. J. The Emerging Role of Exosomes in Epithelial-Mesenchymal-Transition in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1–5, 2014.
- VOUTSADAKIS, I. A. Ubiquitination and the Ubiquitin-Proteasome System as regulators of transcription and transcription factors in epithelial mesenchymal transition of cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 33, n. 4, p. 897–910, 2012.
- WANG, H. et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, n. 1, p. 156–166, 2014a.
- WANG, H. W. et al. Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 9, p. 2019–2027, 2007.
- WANG, J. et al. Suppression of TGF- β 1 enhances chemosensitivity of cisplatin-resistant lung cancer cells through the inhibition of drug-resistant proteins. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 1401, n. September, p. 0–8, 2017.

- WANG, P. et al. Crenolanib, a PDGFR inhibitor, suppresses lung cancer cell proliferation and inhibits tumor growth in vivo. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 1761–1768, 2014b.
- WANG, S. et al. DNA Repair Genes ERCC1 and BRCA1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Chemotherapy Drug Resistance. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1999–2005, 2016.
- WANG, W.; LIU, X.; TANG, C. The difference between multi-drug resistant cell line A549/Gem and its parental cell A549. **Chinese-German Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 190–194, 2009.
- WANG, X.; MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39435–39443, 2000.
- WANG, Y.-D.; LI, S.-J.; LIAO, J.-X. Inhibition of Glucose Transporter 1 (GLUT1) Chemosensitized Head and Neck Cancer Cells to Cisplatin. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 12, n. 6, p. 525–535, 2013.
- WIERSTRA, I. FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis. Overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy. **Advances in Cancer Research**, v. 119, p. 191–419, 2013.
- WINDOFFER, R. et al. Cytoskeleton in motion: The dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 5, p. 669–678, 2011.
- WITSCH, E.; SELA, M.; YARDEN, Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. **Physiology**, v. 25, n. 2, p. 85–101, 2010.
- WONG, M. C. S. et al. Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Fact sheet on Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 01 Jun. 2018.
- WU, B. et al. F-box protein FBXO22 mediates polyubiquitination and degradation of CD147 to reverse cisplatin resistance of tumor cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.

XIAO, X. et al. Exosomes: Decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2014.

XIN, X. et al. CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 113, p. 1–12, 2016.

YANG, A. D. et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 14, p. 4147–4153, 2006a.

YANG, H. et al. Bridge linkage role played by CD98hc of anti-tumor drug resistance and cancer metastasis on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 6, n. 6, p. 942–947, 2007.

YANG, S. J. et al. Predictive role of GSTP1-containing exosomes in chemotherapy-resistant breast cancer. **Gene**, v. 623, p. 5–14, 2017.

YANG, Z. et al. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: Possible role in apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 19, p. 5817–5825, 2006b.

YOSHIOKA, Y. et al. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, 2013.

YOU, B. et al. Effects of ADAM10 upregulation on progression, migration, and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Science**, v. 106, n. 11, p. 1506–1514, 2015.

YOUNES, B. K. et al. A lowered 26S proteasome activity correlates with mantle lymphoma cell lines resistance to genotoxic stress. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 538, 2017.

YOUNG, L. C. et al. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1 and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1798–1804, 2001.

YU, G. et al. FoxM1 promotes breast tumorigenesis by activating PDGF-A and forming a positive feedback loop with the PDGF/AKT signaling pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11281–94, 2015.

YU, M. et al. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT. **Oncology Reports**, v. 31, n. 6, p. 2751–2758, 2014.

YU, M.; TANNOCK, I. F. Targeting Tumor Architecture to Favor Drug Penetration: A New Weapon to Combat Chemoresistance in Pancreatic Cancer? **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 327–329, 2012.

YUE, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. **J. Glaucoma.**, p. 1–8, 2014.

ZEIDAN, Y. H.; JENKINS, R. W.; HANNUN, Y. A. Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 181, n. 2, p. 335–350, 2008.

ZENG, H. Z. et al. Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3489–3499, 2011a.

ZENG, H. Z. et al. Expression of CD147 in advanced non-small cell lung cancer correlated with cisplatin-based chemotherapy resistance. **Neoplasma**, v. 58, n. 5, p. 449–454, 2011b.

ZHANG, B. et al. Secreted Clusterin gene silencing enhances chemosensitivity of A549 cells to cisplatin through AKT and ERK1/2 pathways in vitro. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 1162–1175, 2014.

ZHANG, H. G. Emerging concepts of tumor exosome-mediated cell-cell communication. New York: **Springer**, 2013.

ZHANG, J. et al. β -catenin signaling pathway regulates cisplatin resistance in lung adenocarcinoma cells by upregulating Bcl-xl. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p. 2543–2551, 2016a.

ZHANG, X. et al. MiR-513a-3p sensitizes human lung adenocarcinoma cells to chemotherapy by targeting GSTP1. **Lung Cancer**, v. 77, n. 3, p. 488–494, 2012.

ZHANG, Y. et al. Reversal of cisplatin resistance by inhibiting PI3K/Akt signal pathway in human lung cancer cells. **Neoplasma**, v. 63, n. 3, p. 362–370, 2016b.

ZHAO, C. et al. C5a induces A549 cell proliferation of non-small cell lung cancer via GDF15 gene activation mediated by GCN5-dependent KLF5 acetylation. **Oncogene**, 2018.

ZHAO, H. et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. **eLife**, v. 5, p. 1–27, 2016.

ZHAO, L. et al. Cisplatin binds to human copper chaperone Cox17: the mechanistic implication of drug delivery to mitochondria. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 50, n. 20, p. 2667–9, 2014.

ZHAO, W. P. et al. Neutralization of complement regulatory proteins CD55 and CD59 augments therapeutic effect of herceptin against lung carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 21, n. 6, p. 1405–1411, 2009.

ZHOU, Y. et al. NID1, a new regulator of EMT required for metastasis and chemoresistance of ovarian cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33110–33121, 2017.

CURRICULUM VITAE resumido

BALBINOTTI, H.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Helier Balbinotti da Silveira

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil – 30/08/1985

Endereços profissionais:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1) Centro de Biotecnologia (CBiot)

Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, salas 204/206/210

Agronomia – Porto Alegre

91501-970, RS – Brasil

2) Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL)

Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43300

Agronomia – Porto Alegre

91509-900, RS – Brasil

Telefones profissionais: 51 3308-6070 (CBiot)/3308-9945 (CREAL)

E-mail: helierbalbinotti@gmail.com

2. FORMAÇÃO

2004 – 2006

Técnico em Biotecnologia

Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

2007 – 2013

Graduação de Licenciado em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Título: O professor e os seus personagens em sala de aula

Orientadora: Profa. Eunice Aita Isaia Kindel

2014 – 2015

Graduação de Bacharel em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Título: Monitoramento molecular bacteriológico de ratos Wistar

Orientador: Prof. Arnaldo Zaha

2015 – 2017

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Título: Proteínas de vesículas extracelulares secretadas por células humanas de adenocarcinoma de pulmão sensíveis e resistentes a cisplatina e suas possíveis funções na transferência intercelular de quimiorresistência

Orientadora: Profa. Karina Mariante Monteiro

3. ESTÁGIOS

2008 – 2011

Bolsista de Iniciação Científica

Agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Vínculo: Graduação

Instituição: UFRGS, CBiot, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos

Orientador: Prof. Arnaldo Zaha

Atividades desenvolvidas: estudo da região 5'UTR do gene EgAgB8/1 de *Echinococcus granulosus*; genotipagem de espécies de *Echinococcus* de cistos hidáticos de bovinos; caracterização funcional da proteína GAPDH de *E. granulosus*.

2014 – 2015

Iniciação Científica de forma voluntária e estágio curricular

Vínculo: Graduação

Instituição: UFRGS, CBIot, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos e CREAL

Orientador: Prof. Arnaldo Zaha

Coorientadora: Profa. Marisa da Costa

Atividades desenvolvidas: padronização de metodologias e técnicas moleculares para a investigação de bactérias patogênicas específicas e da microbiota bacteriana cultivável presente em ratos Wistar.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

BALBINOTTI, H.; SANTOS, G. B.; BADARACO, J.; AREND, A.C.; GRAICHEN, D. A. S.; HAAG, K. L.; ZAHA, A. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Veterinary Parasitology* (Online), v. 188, p. 255-260, 2012.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

BALBINOTTI, H.; AREND, A.C.; ZAHA, A. estudo da região 5'UTR do gene EgAgB8/1 de *Echinococcus granulosus*. In: XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2008.

BALBINOTTI, H.; AREND, A.C.; ZAHA, A. Identificação Molecular de Linhagens de *Echinococcus granulosus* no Estado do Rio Grande do Sul. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2009.

BALBINOTTI, H.; AREND, A.C.; ZAHA, A. Caracterização genotípica de *Echinococcus granulosus* no Estado do Rio Grande do Sul. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, Foz do Iguaçu, 2009.

BALBINOTTI, H.; LORENZATTO, K. ; MONTEIRO, K. ; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Caracterização de possíveis funções *moonlighting* da GAPDH de *Echinococcus*

granulosus na interação com o hospedeiro intermediário. In: XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2010.

BALBINOTTI, H.; LORENZATTO, K.; MONTEIRO, K.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Estudo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Echinococcus granulosus*. In: XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, 2011.

BALBINOTTI, H.; LORENZATTO, K.; MONTEIRO, K.; ZAHA, A. Interação da GAPDH recombinante de *Echinococcus granulosus* com a GAPDH de *Escherichia coli*. In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, São Paulo, 2011.

DUTRA, C.S., MARTELLO, C., BALBINOTTI, H., CADORE, N., MONTEIRO, K. Identification of newly synthesized proteins in human lung adenocarcinoma cells exposed to cisplatin. In: 6º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, Brasília, 2015.