GRAZIELA GORETE ROMAGNOLI

**EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO
ADJUVANTES NATURAIS NA RESPOSTA ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

GRAZIELA GORETE ROMAGNOLI

**EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO
ADJUVANTES NATURAIS NA RESPOSTA ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Romagnoli, Graziela Gorete.

Exossomos derivados de células dendríticas como adjuvantes naturais na resposta antitumoral / Graziela Gorete Romagnoli. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia de Tumores

Versão do título para o inglês: Dendritic cells-derived exosomes as natural adjuvants in antitumor responses.

1. Células dendríticas 2. Exossomos 3. Imunoterapia 4. Células tumorais I. Barbuto, Prof. Dr. José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB048/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Graziela Gorete Romagnoli.

Título da Tese: Exossomos derivados de células dendríticas como adjuvantes naturais na resposta antitumoral.

Orientador(a): Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de novembro de 2007.

PARECER 819/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 80ª reunião realizada em 13.11.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Exossomos derivados de células dendríticas como adjuvantes naturais na resposta antitumoral*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **13 de novembro de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
GRAZIELA GORETE ROMAGNOLI
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Aos meus pais Antonio Carlos e Antonia, pelo exemplo de vida e por todos os esforços dedicados para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado com esta oportunidade e por sempre estar comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Aproveito para utilizar suas próprias palavras (*memorial Livre Docência*), as quais resumem muito bem o seu comprometimento com os alunos: apontar caminhos, desafiar e oferecer instrumentos. Muito obrigada!

Aos professores Dra. Maristela Camargo, Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues e Dr. Roger Chammas pelas sugestões e críticas durante o exame de qualificação.

Aos professores Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes e Dra. Karina Ramalho Bortoluci pela atenção, críticas e gentil disponibilização dos laboratórios.

À Dra Élia Garcia Caldini e Dr. Marcelo Alves Ferreira da FMUSP pela confiança na proposta do trabalho e por realizar as análises por microscopia eletrônica.

Ao Prof. Dr. Esper Kallás e Dra. Karina Carvalho da FMUSP pela atenção e por disponibilizar o laboratório para as análises de Elispot.

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno do IBB-UNESP por toda atenção e discussões pertinentes.

A todos os professores do departamento de Imunologia/ICB-USP pela contribuição na minha formação profissional, bem como disponibilização de laboratórios e reagentes.

Aos funcionários Jotelma, Amanda, Eni, Thiago e Amarildo (*in memoriam*) pela atenção e grande ajuda nos tramites burocráticos.

Aos amigos da portaria Milton, Otacílio e Delman que sempre nos recebem com um alegre Bom Dia, o que torna nosso dia muito mais agradável. E também aos funcionários do turno da noite e de finais de semana Ailton, Geraldo, Nelson e Roberto pela atenção e cuidado com a nossa segurança.

Aos funcionários do setor Audiovisual Moisés, Márcio e Andréas por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

À Célia e Claudinha, técnicas do Lab. Imunologia de Tumores, por toda disponibilidade e ajuda. Meu agradecimento em especial à Célia pelas ajudas aos finais de semana e pelo ensinamento de rotina de laboratório, mas acima de tudo, pela amizade e companheirismo.

À Silvana (Sil), técnica do Laboratório de Imunofisiopatologia, pela ajuda sempre que necessária.

Às minhas queridas amigas do lab. Ana Paula, Bella, Bruninha, Gio Cechim, Lilian e Patty Toniolo, por todas as discussões e auxílios experimentais, mas acima de tudo pelo companheirismo e amizade. Vocês são especiais!!!

Aos amigos que já passaram e aos presentes do Lab. de Imunologia de Tumores Ana Carolina, Andréia, Bruno, Clarinha, Cristiano, Elizabeth, Gabi, Giovana Alonso, JP, Karen, Lucila, Márcio, Maria (Mary Happy), Mariana, Marisa, Murilo, Otávio, Patrícia Bergami, Renato (Renatson Boy), Roberta, Roberto e Rodrigo pelos auxílios, trocas de experiências e pela boa companhia dentro e fora do laboratório.

Aos demais colegas de departamento pela amizade, discussões imunológicas e momentos de descontração. Em especial a Thaís Boccia, Júlia Campopiano e Maria Emília por todos os auxílios prestados.

Ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, pela execução das plaquetaferese nos doadores saudáveis. E em especial aos doadores, pois sem eles este trabalho não poderia ter sido realizado.

À FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais por todo carinho, apoio (emocional e financeiro) e incentivo em todos os momentos. Aos meus irmãos Helton, Fabi, Lilian e César pelo apoio e sustentação com suas orações a Deus.

Ao meu amado Tony, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me compreendendo e me encorajando. Obrigada também pela ajuda nas análises estatísticas. À sua família (minha futura família também) pela torcida e apoio sempre presentes.

Aos meus amigos “botucudos” Carolzinha, Claudinho e Edilaine, por estarem ao meu lado sempre que precisei e pela torcida.

Aos sempre amigos de UEL Camila, Gisele, Letícia, Flávia, Ariane, Thaís (Tata), Juliana e Wanner pela torcida e encorajamento.

Às minhas amigas de “apê” Andréia (amiga Andréia), Gabi, Fran, Melissa e Maria, pela torcida e pelos momentos de descontração.

***"Apesar dos nossos defeitos,
precisamos enxergar que somos pérolas
únicas no teatro da vida e entender que não
existem pessoas de sucesso e pessoas
fracassadas. O que existem são pessoas
que lutam pelos seus sonhos ou desistem
deles."***

Augusto Cury

RESUMO

Romagnoli, GG. Exossomos derivados de células dendríticas como adjuvantes naturais na resposta antitumoral. [Tese (Doutorado em Imunologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Os vários mecanismos de escape de neoplasias malignas frente ao sistema imune tornam o desenvolvimento de vacinas antitumorais efetivas um alvo elusivo. Neste contexto, exossomos produzidos por células dendríticas (DCs) aparecem como um instrumento potencialmente útil. Exossomos (Exo) são nanovesículas que resultam da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática, e que estão envolvidas na comunicação intercelular. Exo originados de DCs carregam diversas moléculas associadas à apresentação antigênica, são capazes de induzir direta e indiretamente a resposta linfocitária e podem também induzir a maturação/ativação de DCs imaturas. Assim, o presente trabalho procurou estabelecer se exossomos de DCs seriam capazes de modificar o fenótipo de células tumorais, de maneira a torná-las capazes de induzir/ativar respostas de linfócitos T. Os Exo foram isolados do sobrenadante de cultura das DCs, diferenciadas a partir de monócitos de doadores saudáveis. A análise fenotípica, por citometria de fluxo, evidenciou a presença das moléculas HLA-classe I, HLA-classe II, CD86, CD11c, CD81, CD54 e CD18 nos Exo de DCs maduras (mExo). Após caracterização, os mExo foram adicionados às células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3, as quais passaram a expressar as moléculas HLA-classe II, CD80, CD86 e CD11c. O tratamento também modulou os níveis de moléculas já presentes nas células tumorais, como CD54, CD9 e CD81. A ligação dos Exo às células tumorais foi parcialmente inibida pelo tratamento com anticorpos anti-CD9, uma tetraspanina aparentemente envolvida na incorporação. As células tumorais modificadas pelos Exo de DCs não foram capazes de induzir proliferação ou sofrer ação citotóxica de linfócitos T, mas induziram a produção de IL-6 e IL-10, detectados no sobrenadante das co-culturas. Células tumorais tratadas com Exo de DCs induziram aumento do número de linfócitos produtores de IFN- γ , pré-sensibilizados contra antígenos tumorais, além do aumento da expressão de SOCS3 nestes. Em conclusão, nossos resultados mostram que, nas condições estudadas, Exo obtidos de células do sistema imune alteram o fenótipo de células tumorais, modificando sua interação com linfócitos T, sem, no entanto, induzir nas mesmas capacidade de ativar respostas proliferativas ou citotóxicas *in vitro*.

Palavras-Chave: Células Dendríticas. Exossomos. Imunoterapia. Células Tumorais

ABSTRACT

Romagnoli, GG. Dendritic cells-derived exosomes as natural adjuvants in antitumor responses. Ph. D. Thesis (Immunology) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas of Universidade de São Paulo, 2012.

The several mechanisms of tumor escape from immune system turn be the development antitumor vaccines an elusive goal. In this context, exosomes produced by dendritic cells (DCs) appear as a potentially useful tool. Exosomes (Exo) are nanovesicles that result from the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane and are involved in the intercellular communication in the body. Exo originated from DCs contain many of the molecules involved in antigen presentation, they are able to induce direct and indirect lymphocyte responses and can lead to maturation/activation of immature DCs. Therefore, the present work sought to determine if exosomes to DCs would be able to modify the phenotype of tumor cells in order to make them capable of inducing/activating responses of T lymphocytes. Exo were isolated from mDCs culture supernatant, which were differentiated from healthy donors' blood monocytes. Analysis of the phenotype by flow cytometry showed that Exo of mature DCs (mExo) carried HLA-class I, HLA-class II, CD86, CD11c, CD81, CD54 and CD18. After phenotyping, Exo were added to cultures of the human breast adenocarcinoma cell line, SK-BR-3, which started to express HLA-class II, CD86, CD80 and CD11c. The treatment also modulated the levels of CD54, CD9 e CD81, molecules already present on tumor cells. The binding of Exo to tumor cells was partially inhibited by treatment with anti-CD9, a tetraspanin apparently involved in incorporation. Tumor cells modified by Exo from DCs were not able to induce T lymphocytes proliferation and cytotoxicity action, but induced IL-6 and IL-10 production, detected in the supernatant of co-cultures. Tumor cells treated with DCs Exo also induced increase the IFN- γ -producing T lymphocytes, pre-sensitization against tumor antigens, furthermore increased expression of SOCS3 in these. In conclusion, our results show that, under the conditions studied, Exo obtained from cells of the immune system alter the phenotype of tumor cells, modifying its interaction with T lymphocytes, without, however, induce in the same ability to activate cytotoxic or proliferative responses *in vitro*.

Key words: Dendritic Cells. Exosomes. Immunotherapy. Tumor Cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Janela principal de análise das populações de monócitos, iDCs e mDCs	37
Figura 2 - Fenótipo da população de células dendríticas imaturas (iDCs) originadas a partir de monócitos de doadores saudáveis.	54
Figura 3 - Fenótipo da população de células dendríticas maduras (mDCs).	55
Figura 4 - Fenótipo da população de monócitos obtidos a partir de doadores saudáveis.	55
Figura 5 - Porcentagem células dentro do gate baseado no tamanho (SSC) e na granulosidade (SSC) dos respectivos tipos celulares (R1).	56
Figura 6 - Frequência células CD14 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD14 em Monócitos, iDCs e mDCs.	57
Figura 7 - Frequência células HLA-DR ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula HLA-DR em Monócitos, iDCs e mDCs.	57
Figura 8 - Frequência células CD80 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD80 em monócitos, iDCs e mDCs.	58
Figura 9 - Frequência células CD86 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD86 em monócitos, iDCs e mDCs.	59
Figura 10 - Frequência células CD83 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD83 em monócitos, iDCs e mDCs.	59
Figura 11 - Frequência células CD40 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD40 em monócitos, iDCs e mDCs.	60
Figura 12 - Frequência células CD11c ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD11c em monócitos, iDCs e mDCs.	61
Figura 13 - Frequência células CD1a ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD1a em monócitos, iDCs e mDCs.	61
Figura 14 - Frequência células CD123 ⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD123 em monócitos, iDCs e mDCs.	62
Figura 15 - Rendimento das culturas de monócitos, iDCs e mDCs.	63
Figura 16 - Expressão dos marcadores CD9, CD81, CD54 e CD18 em monócitos, iDCs e mDCs.	63
Figura 17 - Quantificação de proteínas na suspensão de exossomos de DCs.	64

Figura 18 - Estratégia de análise dos exossomos por citometria de fluxo	65
Figura 19 - Imunofenotipagem de mDCs por citometria de fluxo.....	66
Figura 20 - Presença de moléculas envolvidas com ativação linfocitária nos exossomos obtidos de mDCs (mExo).	67
Figura 21 - Presença de moléculas envolvidas com adesão celular nos exossomos obtidos de mDCs (mExo).	68
Figura 22 - Fotomicrografia das nanovesículas purificadas/enriquecidas no sobrenadante de mDCs.....	69
Figura 23 - Fenotipagem da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3	70
Figura 24 - Ausência de Contaminação por Micoplasma nas células SK-BR-3.	71
Figura 25 - Efeito do tratamento com mExo sobre a morfologia de iDCs.....	72
Figura 26 - Presença das moléculas HLA-ABC, HLA-DR, CD86 e CD81 nos mExo.	74
Figura 27 - Incorporação das moléculas HLA-DR, CD83 e CD11c pelas células SK-BR-3, após tratamento com mExo.	75
Figura 28 - Presença das moléculas CD9 e CD81 nos mExo.	76
Figura 29 - Alteração na expressão das moléculas CD54 e CD9 nas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com mExo.....	77
Figura 30 - Intensidade dos marcadores de superfície avaliados nos mExo.	78
Figura 31 - Cinética de incorporação das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 pelas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com diferentes mExo.	79
Figura 32 - Cinética de incorporação das moléculas CD11c, CD54, CD9 e CD81 pelas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com diferentes mExo.....	80
Figura 33 - Incorporação de mExo por células tumorais humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.	81
Figura 34 - Envolvimento da tetraspanina CD9 na incorporação de mExo pelas células tumorais SK-BR-3.	83
Figura 35 - Avaliação da produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISA nas co-culturas.	84
Figura 36 - Avaliação da produção de IL-10 pelo ensaio de ELISA nas co-culturas.	85

Figura 37 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com mExo (alogênicos).....	86
Figura 38 - Variação da expressão de tetraspaninas nas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com pool de Exo.	88
Figura 39 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com pools de iExo e mExo (alogênicos).....	89
Figura 40 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com pools de iExo e mExo (alogênicos).....	90
Figura 41 - Perfil de expressão das moléculas HLA-DP,DQ,DR, HLA-ABC, CD80, CD86 e CD54 nas mDCs tratadas ou não com exossomos tumorais.	92
Figura 42 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com iExo e mExo (alogênicos).....	94
Figura 43 - Dosagem de IFN- γ ao 3º dia, pela técnica de ELISA, da co-cultura de linfócitos TCD3 ⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com Exo.	95
Figura 44 - Dosagem de IL-10 ao 3º dia, pela técnica de ELISA, da co-cultura de linfócitos TCD3 ⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com Exo.	96
Figura 45 - Esquema do protocolo de sensibilização de linfócitos TCD3 ⁺ contra exossomos tumorais (Tex).	98
Figura 46 - Esquema do ensaio de linfoestimulação autólogo por células tumorais, tratadas ou não com dExo Tex.....	100
Figura 47 - Detecção de IL-6 no sobrenadante das co-culturas de linfócitos T CD3 ⁺ , sensibilizados para Tex, com células tumorais SK-BR-3.	101
Figura 48 - Aumento do número de linfócitos T produtores de IFN- γ ⁺ sensibilizados contra antígenos tumorais, após co-cultura com células tumorais SK-BR-3.....	102
Figura 49 - Maior expressão relativa do mRNA de SOCS3 em linfócitos co-cultivados com células tumorais tratadas com dExo Tex.	103
Figura 50 - Esquema do protocolo de sensibilização de linfócitos TCD3 ⁺ contra BSA e proteína quimérica Her-2/neu.....	104
Figura 51 - Esquema do ensaio de citotoxicidade autólogo.	106
Figura 52 - Células tumorais SK-BR-3 tratadas com dExo são alvos de linfócitos T CD3 ⁺ sensibilizados contra BSA.	107
Figura 53 - Esquema do ensaio de linfoestimulação autólogo.	108

Figura 54 - Dosagem por CBA da produção de IL-6 das co-culturas de linfócitos TCD3 ⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com dExo.	109
Anexo A - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores CD14, CD11c, CD1a e CD123 em monócitos, iDCs e mDCs.....	140
Anexo B - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83 em monócitos, iDCs e mDCs.....	141
Anexo C - Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas CD9, CD81, CD54 e CD11c na superfície das células tumorais após tratamento com dExo.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados referentes aos anticorpos murinos anti-humano usados para citometria de fluxo.....	37
Tabela 2 - Marcadores de superfície utilizados na fenotipagem de DCs.....	53
Tabela 3 - Delineamento experimental do tratamento com mExo sob monócitos.....	72
Tabela 4 - Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) dos marcadores de superfície nas DCs após tratamento ou não com mExo alogênicos.....	73
Tabela 5 - Células SK-BR-3 foram tratadas com mExo em diferentes concentrações e tempos.....	74
Tabela 6 - Detecção de citocinas do sobrenadante de co-cultura através do ensaio imunoenzimático acoplado a microesferas fluorescentes (BIOPLEX).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AET	2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide
ANOVA	Análise de Variância
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BSA	Albumina Sérica Bovina
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR7	Receptor de Quimiocina -7
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i>
CNAs	Células Não Aderentes
Ctrl	Controle
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos
DCs	Células Dendríticas
DEPC	Água Tratada com Dietil Dicarbonato
dExo	Exossomos de células dendríticas maduras
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatado
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
Exo	Exossomos
Fc	Fragmento constante das imunoglobulinas
FDCs	Células Dendríticas Foliculares
FSC	<i>Foward Scatter</i>
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
Gy	Gray
HER-2/neu	receptor de fator de crescimento de epiderme 2
Her-2/neu-Fc	proteína quimérica

iDCs	Células Dendríticas imaturas
iExo	Exossomos de células dendríticas imaturas
IFN- γ	interferon-gama
IL	Interleucina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSP	Proteínas de Choque Térmico
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mDCs	Células Dendríticas maduras
MDSCs	<i>Myeloid-Derived Supressor Cells</i>
mExo	Exossomos de células dendríticas maduras
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
MFIrelativa	Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
mRNA	RNA mensageiro
MTT	[3-(4,5-dimethyl-thyazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide]
MVB	Corpos Multivesiculares
NK	Células <i>Natural Killer</i>
Nm	Nanômetros
PB	pares de bases
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE-2	Prostaglandina E2
PI	Iodeto de Propídeo
pSTAT3	STAT3 fosforilada
RPM	rotação por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

R10	RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino
RT	Transcrição Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SK-BR-3	Linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3
SOCS	<i>Supressors of Cytokines Signaling</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STATs	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
TCR	Receptor de Células T
Tex	Exossomos das células tumorais SK-BR-3
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
Th1	Células T “ <i>helper</i> ” 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
Tregs	Linfócitos T reguladores
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	22
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Casuística	33
3.2 Isolamento de monócitos por aderência e diferenciação em DCs.....	33
3.3 Separação de monócitos por microesferas magnéticas e diferenciação em DCs	34
3.4 Avaliação do fenótipo de membrana de monócitos e células dendríticas por citometria de fluxo.....	35
3.5 Obtenção e quantificação dos Exo	38
3.6 Caracterização dos Exo	38
3.7 Microscopia eletrônica.....	39
3.8 Cultura da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.....	39
3.9 Reação em cadeia da polimerase para detecção de contaminação por micoplasma.....	40
3.10 Ensaio de redução do MTT para determinar a dosagem de radiação γ a ser aplicada nas células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.....	41
3.11 Tratamento das células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3 com Exo	42
3.12 Microscopia de fluorescência	42
3.13 Separação de linfócitos T	43
3.14 Ensaio de linfoestimulação alogênico.....	44
3.15 Expansão de linfócitos T autólogos	45
3.16 Avaliação da citotoxicidade celular	46
3.17 Detecção da produção de citocinas por ELISA	46

3.18 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX	47
3.19 Detecção da produção de citocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array – CBA)	47
3.20 Determinação do número de células produtoras de IFN-γ pela técnica de Elispot	48
3.21 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para análise da expressão de SOCS3	49
3.21.1 Extração do RNA tumoral.....	49
3.21.2 Obtenção do DNA complementar.....	49
3.21.3 PCR quantitativo.....	49
3.22 Análises estatísticas	50
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Caracterização das células e nanovesículas utilizadas.....	53
4.1.1 Obtenção e caracterização das células dendríticas a partir de monócitos	53
4.1.2 Caracterização de iExo e mExo	64
4.1.3 Fenotipagem da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3 e análise para detecção de micoplasma.	69
4.2 Ensaios Funcionais.....	71
4.2.1 Ensaio para verificar a capacidade de modificação fenotípica celular pelo tratamento com Exossomos obtidos de DCs.....	71
4.2.2 Incorporação de Exo pelas células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.....	73
4.2.3 Confirmação da incorporação de Exo pelas células tumorais por microscopia de fluorescência.	80
4.2.4 Envolvimento da tetraspanina CD9 na incorporação de Exo pelas células tumorais.....	82
4.2.5 Ensaios para verificar a capacidade aloestimuladora das células tumorais SK-BR-3 tratadas com exossomos de DCs.....	83
4.2.5.1 Ensaios de linfoestimulação	83
4.2.5.2 Outras estratégias empregadas para tentar avaliar a linfoestimulação por células tumorais tratadas com mExo.....	87

<u>4.2.5.2.1 Formação de pool de exossomos</u>	87
<u>4.2.5.2.2 Adição de IL-2 a co-cultura</u>	89
<u>4.2.5.2.3 Adição de TGF-β a co-cultura</u>	91
<u>4.2.5.2.4 Análise da sensibilização de linfócitos</u>	91
<i>4.2.5.3 Ensaios de linfoestimulação autólogos</i>	97
<u>4.2.5.3.1 Ensaios com linfócitos TCD3⁺ sensibilizados contra exossomos tumorais por DCs</u>	97
<u>4.2.5.3.2 Ensaios com linfócitos TCD3⁺ sensibilizados contra a proteína quimérica Her-2/neu-Fc por DCs</u>	103
5 DISCUSSÃO	110
6 CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	127
ANEXOS	139
Anexo A - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores CD14, CD11c, CD1a e CD123 em monócitos, iDCs e mDCs	140
Anexo B - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83 em monócitos, iDCs e mDCs ..	141
Anexo C - Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas CD9, CD81, CD54 e CD11c na superfície das células tumorais após tratamento com dExo	142

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de neoplasias em um indivíduo com o sistema imune íntegro está relacionado, provavelmente, a mecanismos de evasão de células tumorais aos mecanismos efetores do sistema imune (Barbuto, 1999). Neste contexto, a imunoterapia do câncer é hoje uma das áreas mais desafiadoras dentro da imunologia e a construção de vacinas que gerem uma resposta imune específica, duradoura, contra tumores estabelecidos é uma busca constante.

Uma vez que a resposta imune específica se dá pela seleção de clones de linfócitos T antígeno-específicos, ativados por uma apresentação eficiente de peptídeos antigênicos, as células dendríticas (DCs) adquirem um papel chave nesse processo. Elas são as únicas células apresentadoras de antígenos (APCs) com habilidade de estimular linfócitos T *naïve* (Banchereau e Steinman, 1998; Steinman et al., 1991). As DCs se encontram amplamente distribuídas nos tecidos, num estado “imaturo” e apresentam uma grande capacidade endocítica, realizando uma amostragem contínua do microambiente onde se encontram (Banchereau e Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000; Mohamadzadeh, 2004;). Frente a determinados estímulos, estas DCs imaturas sofrem um processo de diferenciação/maturação, apresentando redução de sua capacidade endocítica, mas por outro lado, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e passando a expressar receptores para quimiocinas, como o CCR7, que dirigem sua migração para áreas de linfócitos T em órgãos linfóides secundários (Caux et al., 1994a; Guernonprez et al., 2002; Yanagihara, et al. 1998). Nos órgãos linfóides secundários, as DCs são capazes de recrutar outras DCs e linfócitos T, através da liberação de quimiocinas facilitando as interações celulares necessárias para o desenvolvimento de uma resposta específica eficiente (Adema et al., 1997; Katou et al., 2001; Sallusto et al., 1999; Sozzani et al., 1998). A maturação das DCs também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II) e de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) em sua superfície, bem como pela produção de diversas citocinas, o que contribui para sua capacidade de ativação dos linfócitos T (Arina et al., 2002; Banchereau et al., 2000; Caux et al. 1994a).

Considerando o papel das DCs na indução da resposta imune, portanto, vários estudos, tanto em modelos murinos, quanto em seres humanos, vêm sendo desenvolvidos, na tentativa de usar as DCs para indução de respostas antitumorais eficazes (Dranoff et al., 1993; Kugler et al., 2000; Murphy et al., 1996; Nestle et al.,

1998; Porgador et al., 1995). Nosso grupo demonstrou que a vacinação com células híbridas, construída a partir de células tumorais autólogas, de pacientes com melanoma metastático ou com carcinoma renal, fundidas com células dendríticas alogênicas é capaz de afetar a história natural destas doenças. Esta vacinação levou a uma estabilização da doença em cerca de 70% dos pacientes, por um período mediano de cerca de 6 meses, e sem presença de efeitos colaterais significativos (Barbuto et al., 2004). Esta estratégia, de fusão de células tumorais com DCs, busca permitir que antígenos tumorais, conhecidos ou não, sejam processados endogenamente, pelas DCs, e apresentados via moléculas de MHC-I e MHC-II, juntamente com moléculas co-estimuladoras (Gong et al., 2000; Gong et al., 1998; Gong et al., 1997).

Na verdade, uma característica importante das DCs, quando se considera a imunoterapia do câncer, é sua capacidade de realizar o *cross-priming* (Arina et al., 2002; Melero et al., 2006), fenômeno que consiste na capacidade de direcionar antígenos internalizados pela APC para apresentação via MHC-I (Albert et al., 1998; Bevan et al., 1976; Norbury et al., 1997). Uma vez que esta apresentação no contexto de MHC-I é associada à ativação de linfócitos T citotóxicos (CTL) (Bevan et al., 1976) e estas células são consideradas como as de maior relevância numa resposta anti-tumoral (Roth et al., 1994), qualquer estratégia que facilite ou aumente este fenômeno deve ser estudada.

Embora os mecanismos que expliquem o *cross-priming* nas DCs ainda não sejam perfeitamente conhecidos, um fator que parece facilitar o fenômeno é a “transferência” de peptídeos antigênicos por proteínas de choque térmico (HSPs), como a gp96 e a HSP70 (Li et al., 2002; Srivastava et al., 2002; Tamura et al., 1997). Além do mais, algumas HSPs obtidas de células tumorais parecem carregar antígenos tumorais e, uma vez internalizadas por DCs, através da ligação com receptores de endocitose, podem resultar na apresentação desses antígenos via MHC-I, o que em camundongos, portadores de tumor, induziu um aumento da resposta de linfócitos T CD8⁺, levando à redução ou eliminação da neoplasia (Berwin et al., 2001; Blachere et al., 1997; Castellino et al., 2000; Kurotaki et al., 2007; Singh-Jasuja et al., 2000; Tamura et al., 1997). Embora do ponto de vista estratégico, as HSPs ofereçam a vantagem de interagir com seus receptores na superfície das DCs, e induzir um forte sinal de maturação nessas células (Binder et al., 2000a; Binder et al., 2000b; Chandawarkar et al., 1999), esta estratégia tem

limitações na aplicação clínica. Primeiro pela própria dificuldade da construção do complexo HSP-peptídeo tumoral; segundo, pela necessidade de grande quantidade de material removido através de cirurgia para que, então, se consiga uma quantidade suficiente de HSP purificada para uso na imunização (Wang et al., 2006).

Outra estratégia que pode e tem sido usada para aumentar a apresentação de antígenos tumorais no contexto de MHC-I é a transfecção de DCs com mRNA extraído de células tumorais, processo que tem demonstrado, também, eficácia na imunoterapia do câncer (Ashley et al., 1997; Boczkowski et al., 1996). Entretanto, apesar dessas estratégias serem promissoras, nenhuma conseguiu ainda, resultados definitivos, o que estimula a busca de novas alternativas.

Por outro lado, um fenômeno biológico, recentemente redescoberto e que vem ganhando mais atenção na comunidade científica, pode fornecer um instrumento também interessante para a imunoterapia: a produção de exossomos (Exo) por diversos tipos celulares (Raposo et al., 1996; Johnstone et al., 1987). Os Exo são pequenas vesículas, de 30 a 100 nm de diâmetro, de membranas internas, que, parecem se formar dentro de corpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*) na célula. Estes MVB são originados do endossoma tardio e se fundem com a membrana plasmática da célula, liberando seu conteúdo, a partir de então, identificado como “exossomos” (Andre et al., 2004; Raposo et al., 1996; Théry et al., 2002; Zitvogel et al., 1998). A liberação de Exo já foi descrita em várias células, incluindo DCs (Zitvogel et al., 1998), linfócitos B (Raposo et al., 1996); linfócitos T (Zakharova et al., 2007), mastócitos (Skokos et al., 2001), plaquetas (Heijnen et al., 1999) e células tumorais (Wolfers et al., 2001). Os Exo apresentam uma gama variada de moléculas tanto intravesiculares, quanto em sua superfície, as quais podem ser consultadas no banco de dados (ExoCarta) criado em 2009 por Mathivanan e colaboradores. Entre as moléculas intravesiculares chamam a atenção componentes do citoesqueleto como actina e tubulinas, (Théry et al., 2001; Théry et al., 1999) e chaperonas como HSP70 e HSP80 (Andre et al., 2004; Mignot et al., 2006; Segura et al., 2005; Yang et al., 2007). Já na superfície dos Exo podem-se identificar moléculas de adesão como integrinas e tetraspaninas (Segura et al., 2005), moléculas de fusão de membrana como as anexinas (Segura et al., 2005; Théry et al., 2001) e, quando os Exo são derivados de células apresentadoras de antígenos, moléculas de estimulação de linfócitos T como MHC-I, MHC-II e CD86 (Clayton et al., 2001; Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998).

As funções biológicas dos Exo ainda não são totalmente compreendidas, entretanto, sua capacidade de, uma vez liberados, interagir com diversos tipos celulares, faz pensar que eles contribuam para a comunicação intercelular no organismo. De fato, num importante artigo de revisão (Mathivanan et al., 2010), foram propostos alguns mecanismos de ação dessa nova via de comunicação. Dentre eles a interação de proteínas presentes na superfície dos Exo com receptores nas células alvo, mecanismo chamado modo *Justacrine*. Um segundo mecanismo proposto é que proteínas da superfície dos Exo podem ser clivadas por proteases, presentes no meio extracelular, e agir assim, como ligantes solúveis. E por fim, através de sua ligação ou fusão com a membrana plasmática celular, compartilhando assim, proteínas de superfície e do citosol com a célula alvo. Esta ligação dos Exo à membrana plasmática, parece envolver moléculas de adesão presentes nas células-alvo, como as anexinas, que podem imobilizar as nanovesículas através de sua ligação com domínios de *lipid raft* ricos em colesterol (Koumangoye et al., 2011).

Mostrando a capacidade de transferência de informações entre células, estudos da interação entre Exo e DCs têm relatado que estas células são capazes de “capturar” Exo e, após esse evento, passam a expressar moléculas transportadas pelos mesmos, como MHC-II, CD40, CD54 e CD80 (Hao et al., 2006b). Nesse mesmo trabalho ficou evidente a interação entre receptores ricos em manose de DC com receptores de lectina C (DEC 205) dos Exo, bem como a interação LFA-1/CD54, sugerindo que a transferência de informações pelos Exo pode ser “específica”, sendo controlada por moléculas expressas tanto pelos Exo, quanto pelas “células-alvo”. Reforçando esta impressão de “especificidade”, foi observado que exossomos obtidos de linfócitos B, isolados de tonsilas humanas, quando colocados em cultura com células do sistema imune (também isolados das tonsilas), foram preferencialmente aderidos às células dendríticas foliculares (Denzler et al., 2000b). Estes autores observaram por microscopia imunoeletrônica, que os Exo de linfócitos B aderiram 5 vezes mais à membrana das células dendríticas foliculares (FDCs), do que à de linfócitos, macrófagos, DCs e ocasionalmente basófilos e mastócitos, presentes no mesmo preparado. Além disso, eles mostraram que *in situ*, em regiões de células dendríticas foliculares circundadas por linfócitos B, foram verificadas a presença de vários Exo, expressando moléculas de MHC-II, ligados à membrana plasmática das FDCs. Sabe-se que as FDCs expressam, mas não

sintetizam moléculas de MHC-II, portanto, a presença destas moléculas na superfície celular pode ser justificada pela adesão de Exo liberados por linfócitos B, indicando com isso um papel biológico destas nanovesículas nos centros germinativos de tonsilas humanas.

É interessante notar que uma marca constitutiva da superfície dos Exo são as tetraspaninas (Andre et al., 2004). Estas moléculas estão envolvidas na aderência celular, na sinalização funcional e na estimulação celular (Andre et al., 2004; Denzer et al., 2000a). Na apresentação de antígenos, a tetraspanina CD9 mostrou-se necessária para a associação de moléculas de MHC-II em DCs, facilitando, provavelmente, a formação de multímeros de MHC-II, podendo aumentar o estímulo aos linfócitos T (Unternaehrer et al., 2007). Assim, a presença desta molécula em Exo parece reforçar um papel funcional para os mesmos na fisiologia da resposta imune. Além disso, integrinas como LFA-1 (CD11a/CD18) podem atuar como receptor específico de exossomos, como foi demonstrado com DCs murinas CD8⁺ que capturaram mExo, contendo complexo MHC-II/peptídeo, via interação de LFA-1 das DCs com ICAM-1 dos mExo. Esta interação refletiu-se na indução de CD69 em linfócitos T específicos, após co-cultura com DCs tratadas com mExo contendo o complexo MHC-II/peptídeo (Segura et al., 2007).

Devido a esta característica de carregar moléculas importantes presentes em suas células de origem, os exossomos originados de diferentes pacientes, têm ganhado amplitude no campo de diagnóstico, principalmente no câncer, por fornecer uma “biopsia líquida”, a qual é minimamente invasiva (por ser obtida de fluídos corpóreos) e altamente esclarecedora (Pant et al., 2012). Além de moléculas de superfície, exossomos originados de tumores, carregam DNA mitocondrial, retrotransposons e oncogenes amplificados (Balaj et al., 2011). Se por um lado, o uso de exossomo tumorais pode ser uma importante ferramenta para diagnóstico, a sua participação na fisiologia da resposta imune é um pouco controversa. Em algumas situações, Exo derivados de células tumorais parecem servir como uma fonte de antígenos capaz de induzir uma resposta antitumoral até mais eficiente que aquelas induzidas por células tumorais irradiadas, corpos apoptóticos ou lisado tumoral (Wolfers et al., 2001). Por outro lado, em alguns casos o uso exossomos tumorais parece favorecer a manutenção de um ambiente imunossuprimido, que é característico no sítio tumoral de pacientes com câncer (Valenti et al., 2007; Xiang et al., 2009). Exo liberados por células tumorais e que são enriquecidos de “fator de

crescimento transformador β ” (TGF- β) e prostaglandina E2 (PGE₂) demonstraram capacidade de induzir um estado imunossupressor, uma vez que foram capazes de induzir diferenciação de células mielóides da medula óssea em “*myeloid-derived suppressor cells*” (MDSCs), que expressam CD11b e GR1 (Xiang et al., 2009). Este trabalho suscita a hipótese que Exo liberados de tumores podem no sítio tumoral, “atrapalhar” a diferenciação de células dendríticas (DCs) a partir de monócitos, uma vez que, podem induzir nessas últimas células um fenótipo de células supressoras da resposta imune, contribuindo assim para mecanismos de escape.

Diferentemente, exossomos originados de DCs parecem estar mais diretamente envolvidos na geração de uma resposta imune eficiente. Nesse sentido, Raposo et al. (1996) foram os pioneiros a descrever que Exo, originados de linfócitos B transfectados com EBV (vírus de Epstein-Barr), continham moléculas de MHC-II funcionais, capazes de estimular clones de células TCD4⁺ de maneira antígeno-específica. Outros trabalhos demonstraram, ainda, que Exo derivados de DCs murinas, que apresentavam complexos MHC-I/peptídeo tumoral, induziram uma resposta de linfócitos T citotóxicos (CTLs) capaz de inibir o crescimento e/ou levar à rejeição de tumores estabelecidos (Chaput et al., 2004; Hao et al., 2006a; Hao et al., 2006b; Zitvogel et al., 1998), provavelmente, devida à incorporação dos Exo a DCs do hospedeiro *in vivo* (Hao et al., 2006a). Além disso, estas nanovesículas de DCs podem ser usadas como forma de direcionamento de antígenos, uma vez que em estudos pré-clínicos, a vacinação com peptídeos tumorais, apresentou maior eficácia antitumoral quando estes foram carregados por exossomos (Chaput et al., 2004; Viaud et al., 2010). Esta característica de Exo obtidos de DCs de carregar complexo MHC/peptídeo tumoral foi ainda mais eficaz quando as DCs foram ativadas com IFN- γ . Este procedimento levou a alta expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC-II nas DCs, o que resultou na secreção de exossomos altamente imunogênicos, os quais induziram diretamente resposta efetora de linfócitos T (Viaud et al., 2011).

Tudo indica, portanto, que o uso de Exo poderia ser uma estratégia eficiente de apresentação de antígenos ao sistema imune. Além do mais, a sua estabilidade, que chega até a 12 meses quando sob baixa temperatura (Viaud et al., 2011), as torna ainda mais atraentes como instrumento de imunização em situações específicas. Isso é ainda mais relevante quando se consideram outras opções, como

aquelas baseadas em DCs, onde a definição de parâmetros de controle e a estocagem por longo tempo são problemas comumente enfrentados.

A demonstrada capacidade de Exo derivados de DCs, de transferir para outras DCs, moléculas envolvidas na apresentação antigênica, suscita outra possibilidade de uso para estas microvesículas: a transferência de moléculas envolvidas na estimulação de linfócitos T diretamente para as células tumorais. É possível propor que estas células, normalmente muito pouco imunogênicas, se não mesmo tolerogênicas, ao incorporarem Exo derivados de DCs ativadas, se tornem capazes de estimular diretamente linfócitos T. Desta forma, células tumorais poderiam se transformar em células diretamente imunogênicas. É interessante notar que esta estratégia elimina, a princípio, a necessidade de identificação de antígenos tumorais específicos para uso na imunização, pois transfere ao sistema imune do paciente, esta função. Além do mais, uma vez desencadeada uma resposta linfocitária pelas células modificadas pelos Exo, seria possível esperar que a mesma se estendesse às demais células tumorais, não modificadas pelos mesmos, estabelecendo-se assim uma imunidade duradoura contra o tumor.

Finalmente, ainda considerando-se o uso *in vivo* de Exo derivados de DCs maduras, não se pode esquecer que também as DCs presentes no sítio tumoral, poderiam incorporar estas nanovesículas. Ora, as DCs intratumorais, frequentemente “paralisadas” num estado imaturo, ao incorporarem Exo derivados de DCs maduras poderiam adquirir capacidades funcionais de células maduras, notadamente a capacidade de desencadear a resposta de linfócitos T *naïve*, podendo também contribuir, assim, para o estabelecimento de uma resposta imune contra o tumor no indivíduo tratado.

Considerando o contexto apresentado, este estudo investigou o potencial de exossomos de DCs de modificar o fenótipo de células tumorais, pela incorporação de moléculas presentes nos Exo. Uma vez caracterizada esta incorporação, investigaram-se as suas consequências sobre a interação das células tumorais com as células do sistema imune, especificamente os linfócitos T, determinando-se, *in vitro*, qual o potencial imunogênico das células tumorais tratadas com os Exo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar se o tratamento de células tumorais com Exo derivados de células dendríticas torna as células tumorais imunogênicas.

2.2 Específicos

- ✓ caracterizar os Exo obtidos de DCs imaturas e de maduras quanto à presença das moléculas: HLA-ABC, HLA-DR, CD1a, CD9, CD11c, CD18, CD40, CD54, CD80, CD81, CD83 e CD86 (por citometria de fluxo) e comparar o perfil obtido com a expressão das mesmas moléculas pelas células de origem;
- ✓ avaliar a incorporação de moléculas presentes nos Exo derivados de DCs imaturas e/ou maduras por células tumorais da linhagem de adenocarcinoma de mama, SK-BR-3 (através da avaliação dos marcadores de superfície “adquiridos” pelas células tumorais após o tratamento com os Exo);
- ✓ investigar se a incorporação de Exo derivados de DCs imaturas e/ou maduras modifica a capacidade das células SK-BR-3 de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ alogênicos (em relação às DCs de origem dos Exo) e determinar o padrão de citocinas produzidas durante o processo;
- ✓ investigar se a incorporação de Exo derivados de DCs imaturas e/ou maduras torna as células tumorais capazes de sensibilizar *in vitro* linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ autólogos (em relação às DCs de origem dos Exo) para respostas proliferativas e/ou citotóxicas frente às células tumorais tratadas ou não com os Exo, bem como determinar o padrão de citocinas produzidas durante o processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras de sangue necessárias para a diferenciação de células dendríticas e obtenção dos Exo neste estudo foram obtidas junto ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo-SP, a partir de câmaras de leucorredução de plaquetaferese, de doadores saudáveis, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 819/CEP).

3.2 Isolamento de monócitos por aderência e diferenciação em DCs

Foram utilizados aproximadamente 10 mL de produto de câmara de leucorredução de doadores de plaquetas (Néron et al., 2007). Estas câmaras contêm entre 2 a 10×10^8 células mononucleares. As amostras foram colocadas, individualmente, em tubos cônicos de 50 mL, diluídas 1:2 em salina tamponada com fosfato (PBS) e submetidas à centrifugação sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) para obtenção de células mononucleares. O material foi centrifugado a 900G por 30 minutos, a 18° C (raio do rotor de 14,5 cm). A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com RPMI-1640 e centrifugada a 600G por 10 min (raio do rotor de 18 cm). As células foram lavadas por mais 2 vezes a 300 e 200G (raio do rotor de 18 cm). O *pellet* foi coletado, as células quantificadas foram ressuspensas em meio livre de soro fetal bovino (SFB), AIM-V (Gibco BRL, meio de cultura livre de soro, estimuladores artificiais e outros fatores de crescimento exógenos, e que contém albumina, insulina humana recombinante, transferrina humana pasteurizada, gentamicina e vermelho fenol) e colocadas em cultura, na concentração de 5×10^6 /mL. As células foram mantidas em estufa de CO₂ (5%) por 2h a 37° C, para aderência em placas de plástico.

Após esse período, as células não-aderentes (CNAs) foram coletadas e congeladas a -70° C, em meio contendo 90% SFB e 10% de DMSO, para posterior utilização em ensaios para avaliação da resposta linfocitária (Palucka et al., 1998; Neves et al., 2005).

As células aderentes foram cultivadas por 7 dias em meio de cultura AIM-V, contendo 50 ng/mL de GM-CSF (PeproTech Inc.) e 50ng/mL de IL-4 (PeproTech Inc.), em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. No quinto dia de cultura, as células foram estimuladas para maturação com TNF- α na concentração de 50ng/mL (PeproTech Inc.). Assim, no sétimo dia, estas foram removidas utilizando-se PBS gelado, lavadas e sua viabilidade testada por exclusão com Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich). As células viáveis foram contadas e ressuspensas com volume de meio adequado para os ensaios subsequentes. No caso dos ensaios que envolveram a utilização de monócitos e células dendríticas imaturas, estas foram submetidas a um banho de gelo por 10 minutos e com auxílio de *cell scraper*, retiradas da placa no dia zero e no quinto dia da cultura, respectivamente

3.3 Separação de monócitos por microesferas magnéticas e diferenciação em DCs

Para os experimentos autólogos, as DCs utilizadas foram obtidas a partir de células selecionadas para a molécula CD14. Assim, após obtenção das células mononucleares de doadores saudáveis (igual ao item 3.2), estas foram contabilizadas e lavadas em PBS-BSA-EDTA (0,5% de albumina sérica bovina, BSA e 3mM de Ácido tetra-acético etilenodiamina, EDTA), e então enriquecidas com microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec) anti-CD14 (marcador característico de monócitos) e posteriormente magneticamente selecionadas por *MACS®-sorting* de acordo com as instruções do fabricante. Para análise da pureza das subpopulações isoladas foi realizada citometria de fluxo após alguns procedimentos de separação, obtendo-se a pureza $\geq 85\%$. Além da separação por seleção positiva, foram realizadas duas separações de células CD14⁺, por seleção negativa. Neste caso, as células mononucleares foram enriquecidas com microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec) anti-CD19, anti-CD3, anti-CD7, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD123 e anti-glicoforina A (marcadores característicos das populações indesejadas para a cultura) e posteriormente magneticamente selecionadas por *MACS®-sorting* de acordo com as instruções do fabricante. As células eluídas neste processo eram em sua grande maioria CD14⁺ (pureza $\geq 90\%$).

Após seleção, as células foram cultivadas por 7 dias em meio de cultura AIM-V, contendo 50 ng/mL de GM-CSF e 50ng/mL de IL-4, em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. No quinto dia de cultura, as células foram estimuladas pela adição de coquetel de ativação, levando a uma concentração final de 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL1- β , 10ng/mL de IL-6 e 1 μ g/mL de prostaglandina E2 (Sigma-Aldrich). Todas as citocinas utilizadas neste protocolo são da PeproTech Inc. Os demais procedimentos foram realizados de modo semelhante ao descrito no item anterior.

3.4 Avaliação do fenótipo de membrana de monócitos e células dendríticas por citometria de fluxo

Para determinação do fenótipo de membrana de monócitos, DCs imaturas e maduras, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais para as seguintes moléculas de membrana: CD1a, CD11c, CD18, CD54, CD123, CD9, CD81, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, e HLA-DR (molécula do MHC-II) e um conjunto de marcadores (CD3, CD19, CD14 e CD56) que permite a exclusão de tipos celulares potencialmente contaminantes das amostras. Este conjunto é identificado no presente relatório como *linhagens negativas*. A listagem dos anticorpos e fluorocromos utilizados, bem como suas funções são apresentados na tabela 1 e quadro 1, respectivamente.

Após a contagem em câmara de Neubauer, as células ($\sim 2 \times 10^5$) foram colocadas em tubos cônicos de 1,5mL e centrifugadas por 20 segundos a 13000rpm, a 4° C. Foi então, adicionado o anticorpo específico em concentração apropriada para o marcador de interesse e os tubos incubados por 20 minutos a 4° C e ao abrigo de luz. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados e as células lavadas três vezes com 300 μ L/tubo de tampão para citometria (PBS, contendo 0,5% de BSA e 0,02% de azida sódica). Após estas lavagens, as células foram ressuspensas em 300 μ L de tampão para citometria e adquiridas nos citômetros da BD Biosciences, FACSCanto™ II com *software* FACSDiva ou FACSCalibur com o *software* CellQuest. Após aquisição das amostras, os resultados foram analisados no *software* FlowJo versão 7.2.5. (Tree Stars Inc.). Na Figura 1 são demonstradas as janelas de aquisição e análise, onde as células com morfologia de monócitos, iDCs e mDCs foram incluídas na análise pelo *side scatter* (SSC), ou seja,

pela granulosidade, tipo de estrutura e complexidade interna e pelo *forward scatter* (FSC), ou seja, pelo tamanho relativo relacionado por sombra e tempo de passagem, como demonstrado no *gate* R1. As células com morfologia linfocitária (linfócitos B, T e NK) foram excluídas do *gate* principal de análise (R1), sendo representadas pelo *gate* R2.

Quadro 1 - Funções conhecidas das moléculas analisadas

Moléculas	Expressão Celular Principal	Principais Funções Atribuídas
CD1a	Timócitos e células dendríticas (incluindo células de Langerhans)	Apresentação de antígenos não-peptídicos (lipídicos e glicolipídicos) a algumas células T
CD3	Linfócitos T e timócitos	Transdução de sinal do TCR
CD4	Subpopulação de linfócitos T, timócitos, monócitos e macrófagos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD8	Subpopulação de linfócitos T e timócitos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD9	Plaquetas, linfócitos B e T ativados, eosinófilos e basófilos	Modulação de adesão e migração celular; acionamento de ativação plaquetária
CD11c e CD18	Monócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas, células NK	Integrina; adesão de monócitos ao endotélio e às proteínas da matriz extracelular, principal integrina de macrófagos e células dendríticas
CD14	Monócitos, macrófagos e granulócitos	liga-se ao complexo de LPS, necessária para a ativação do macrófago induzida por LPS
CD19	Maioria dos linfócitos B	Formação do complexo CD19-CD21-CD81 para ativação de linfócitos B via BCR
CD40	Linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Liga-se ao CD154 (ligante de CD40); papel na ativação de linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais
CD54 (ICAM I)	Linfócitos B e T, monócitos e células endoteliais	Adesão célula-célula; ligante para CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (Mac-1)
CD56	Células NK, subpopulações de linfócitos T e B, cérebro	Superfamília das imunoglobulinas; Adesão homotípica
CD80	Células dendríticas, linfócitos B e macrófagos	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD81	Células NK, linfócitos T e B, células dendríticas, timócitos e endotélio	Ativação de linfócitos B
CD83	Células dendríticas e de Langerhans, linfócitos B do centro germinativo	Liga-se ao ácido siálico, tem expressão aumentada em células dendríticas maduras
CD86	linfócitos B e T, monócitos, células dendríticas	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD123	Monócitos, macrófagos, megacariócitos	Cadeia α do receptor de IL-3; Liga-se a IL-3 e em associação com CD131, medeia efeitos biológicos de IL-3
HLA-ABC	Em quase todas as células nucleadas	Apresentação dos antígenos peptídicos aos linfócitos T citotóxicos
HLA-DR	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B	Apresentação dos antígenos peptídicos aos linfócitos T auxiliares

FONTES: Abbas et al. (2008); Kindt et al., (2008)

Tabela 1 - Dados referentes aos anticorpos murinos anti-humano usados para citometria de fluxo

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo
CD1a	HI149	IgG1, k	PE
CD3	HIT3a	IgG2a, k	FITC; APC
CD4	RPA-T4	IgG1, k	FITC ; PE
CD8	SK1	IgG1, k	PerCP
CD9	M-L13	IgG1, k	PE
CD11c	B-ly6	IgG1, k	PE
CD14	M5E2	IgG2a, k	FITC; PE
CD18	6.7	IgG1, k	PE
CD19	HIB19	IgG1, k	FITC
CD40	5C3	IgG1, k	PE; PE-Cy5
CD54	HA58	IgG1, k	PE
CD56	NCAM16.2	IgG2b, k	FITC
CD80	L307.4	IgG1, k	PE; PE-Cy5
CD81	JS-81	IgG1, k	PE
CD83	HB15e	IgG1, k	PE; PE-Cy5
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, k	PE; PE-Cy5
CD123	9F5	IgG1, k	PE
HLA-ABC	G46-2.6	IgG1, k	PE
HLA-DR	G46-6	IgG2a, k	PE
HLA-DR	L243 (G46-6)	IgG2a, k	APC

Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isótipo e o fluorocromo, utilizados para fenotipagem de monócitos e células dendríticas. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 1 - Janela principal de análise das populações de monócitos, iDCs e mDCs

Células aderentes, em sua maioria monócitos, foram tratadas com GM-CSF e IL-4 para geração de células dendríticas, as quais foram ativadas com TNF- α . *Dot-plots* demonstrando os *gates* de análise das populações de monócitos, iDCs e mDCs, respectivamente. O *gate* R1 de análise foi baseado no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das populações em questão. Notar que os três tipos celulares estão localizados na região de células grandes e mais granulosas. O *gate* R2 representa as células com morfologia linfocitária, as quais foram excluídas do *gate* principal de análise (R1)

FONTE: Romagnoli (2012)

3.5 Obtenção e quantificação dos Exo

Na maioria dos experimentos, Exo foram isolados tendo como base a descrição de Abusamra et al., (2005), mas com algumas modificações. De modo geral, os sobrenadantes de culturas de DCs foram submetidos a 3 diferentes e sucessivas centrifugações, 300 G por 5 minutos, para remoção das células, 1.200G por 20 minutos e 10.000 G por 30 minutos para remoção dos “debris” celulares. Então, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 G por 2 horas em rotor de ângulo fixo. O *pellet* obtido desta primeira ultracentrifugação foi ressuspensão em PBS e novamente ultracentrifugado a 100.000 G por 2 horas para obtenção do *pellet* contendo Exo. A quantificação de proteínas obtidas do *pellet* recuperado foi pelo BCATM Protein Assay Kit (Pierce).

Após quantificação, o material foi aliquoteado e devidamente identificado para estocagem a -80° C. Os Exo obtidos de células dendríticas imaturas e maduras foram denominados iExo e mExo (ou dExo), respectivamente.

Em alguns experimentos, os exossomos de mDCs foram obtidos seguindo protocolo descrito por Andre et al. (2004), mas com algumas modificações. Após remoção de células e “debris” celulares do sobrenadante, os exossomos foram isolados a partir de ultracentrifugação do sobrenadante em solução de sacarose (30%) com óxido de deutério (D₂O 99%) em densidade 1.194 g/cm³ e seguido de filtração com PBS em tubos com filtro de 100 KDa (Millipore - Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Units). Após quantificação, o material foi aliquoteado e devidamente identificado para estocagem a -80° C.

3.6 Caracterização dos Exo

A expressão de marcadores de superfície nos Exo foi determinada por citometria de fluxo. Os Exo foram incubados com microesferas paramagnéticas de 4,5 µm (Dynabeads M450), previamente recobertas com anticorpos anti-HLA-DP, DQ, DR (Dynabeads[®] HLA Cell PrepTM II, Invitrogen Dynal AS) ou com anticorpos anti-HLA-ABC (Dynabeads[®] HLA Cell PrepTM I, Invitrogen Dynal AS), por 24 horas à temperatura ambiente, de modo similar ao descrito por Lamparski et al., (2002). Este acoplamento foi realizado para ser possível a detecção das nanovesículas no

citômetro de fluxo. Após captura dos Exo pelas microesferas, a expressão das diferentes moléculas de superfície foi avaliada através de marcação simples para os anticorpos marcados contra: CD11c, CD1a, HLA-ABC, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40, CD81, CD9, CD54 e CD18, utilizando o aparelho FACScalibur (BD) e o *software* da BD CellQuest.

3.7 Microscopia eletrônica

A análise por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada pelo Dr. Marcelo Alves Ferreira do Laboratório de Biologia Celular (LIM-59) da FMUSP, coordenado pela Profa. Dra. Élia Garcia Caldini. Para este procedimento, o *pellet* de exossomos foi fixado com PBS- glutaraldeído 2%. O material fixado foi lavado em PBS por ultracentrifugação. O *pellet* foi então incluído em resina araldite. Após inclusão o material foi cortado na espessura de 80 nm e pós-fixado em ósmio para análise.

3.8 Cultura da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3

As células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano, SK-BR-3, foram gentilmente cedidas pela Dra. Anamaria Camargo do Instituto Ludwig- SP, e mantidas em nosso laboratório criopreservadas em nitrogênio líquido. Para os ensaios, as células foram descongeladas em banho-maria a 37° C e rapidamente transferidas para tubo estéril com 10mL de meio cultura e lavadas duas vezes em RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e 1% de antibiótico-antimicótico (10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO), meio este denominado R-10. Na sequência, as células foram centrifugadas durante 10 minutos à 290G. A viabilidade das células foi avaliada, considerando-se um mínimo de 70% de células vivas para manuseio. Após contagem, as células foram plaqueadas a 37° C e sob tensão de 5% CO₂, até atingirem confluência para o uso. Assim, completada a monocamada de células estas foram utilizadas nas culturas com Exo.

Antes dos ensaios funcionais estas células foram caracterizadas fenotipicamente utilizando o mesmo painel de anticorpos usado nas culturas de DCs.

3.9 Reação em cadeia da polimerase para detecção de contaminação por micoplasma

As células tumorais SK-BR-3 também foram avaliadas para a detecção de contaminação por micoplasma. Para tal, buscou-se amplificar o gene para a subunidade 16S do RNA ribossomal de micoplasma, ureaplasma e spiroplasma, a qual é bastante conservada entre as espécies mais comuns de micoplasma (Van Kuppeveld et al., 1992).

Assim, 1×10^6 células tumorais foram coletadas em microtubo de 1,5 mL e submetidas à centrifugação de 18.000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado resultante foi submetido a duas lavagens com 100 μ L de PBS 1x e novamente centrifugado a 18000 G durante 5 minutos. Após as lavagens, as células foram incubadas em bloco térmico a 100° C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 18000 G durante 5 minutos e o sobrenadante resultante contendo o DNA de interesse foi estocado à -20° C.

Após extração, o DNA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase - PCR. Para tal 0,5 μ L de DNA foi adicionado em 25 μ L de volume final da reação de PCR, contendo 10 pmols dos *primers*: GPO3 (5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T - 3') e MGSO (5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC -3'). Foram adicionados à reação 0,2 μ L da enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen), juntamente com 2,5 μ L do seu tampão 10x, 0,5 μ L de dNTP mix a 10mM (Invitrogen), 0,75 μ L de $MgCl_2$ 50 mM (Invitrogen) e água DEPC para a complementação do volume. As condições do ciclo foram: 45 segundos de desnaturação inicial a 94° C, seguido de 40 ciclos de 94° C por 30 segundos para desnaturação, 30 segundos a 55° C para anelamento e por fim 30 segundos a 72° C para extensão e mais 5 minutos a 72° C para extensão final. Como controle positivo utilizou-se o DNA de uma cultura sabidamente contaminada e como controle negativo, não foi adicionado DNA.

A contaminação foi avaliada pela visualização de uma banda de 270 pb, correspondente ao produto do gene amplificado, após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

3.10 Ensaio de redução do MTT para determinar a dosagem de radiação γ a ser aplicada nas células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.

As células SK-BR-3, após incubação com Exo, foram utilizadas como população estimuladora no ensaio de proliferação linfocitária, por um período de 3 a 5 dias. Como estas células tumorais apresentam um crescimento acelerado, faz-se necessário a aplicação de radiação γ para bloqueio de divisão celular, sem, no entanto, causar morte celular. Assim, diferentes concentrações de radiação foram aplicadas às células SK-BR-3, e após 24, 48 e 96 horas da radiação, essas células foram avaliadas pela sua capacidade de inibir a redução do MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide] a cristais de formazan.

Brevemente, as células SK-BR-3 foram retiradas da placa, por raspagem com *cell scraper*, em PBS gelado, contadas e ressuspensas em um volume de R-10 suficiente. Aproximadamente 4×10^6 células foram aliquotadas em diferentes microtubos e submetidas à variadas radiações (12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 50; 100 e 200 gray – sigla Gy). Após radiação, estas células foram novamente contadas e avaliadas pelo método de exclusão com corante *Azul de Trypan*, para detecção da viabilidade celular. Após contagem, 2×10^5 células/100 μ L ou 1×10^4 células/100 μ L foram plaqueadas em placas de 96 poços, com fundo chato. A placa foi levada para estufa de CO₂ a 37° C, por aproximadamente 24 ou 48 e 96 horas. Após estes períodos, foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL), por poço. A placa foi deixada por 4 horas na estufa, para então, serem adicionados 100 μ L/poço de SDS-HCl (10% SDS e 90% HCl 0,1N), para solubilizar os cristais de formazan. A placa foi mantida sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz *overnight*. Decorrido este período, a densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro, com filtro de comprimento de onda de 550 nm.

Após análise, decidiu-se usar a dose de 40 Gy, pois em todos os testes realizados, as doses próximas a este valor (48 e 50 Gy) se mostraram eficazes para o objetivo em questão.

3.11 Tratamento das células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3 com Exo

Após fenotipagem dos exossomos obtidos de iDCs e mDCs, bem como, das células SK-BR-3, estas foram incubadas em diferentes tempos com diferentes concentrações de iExo e mExo à 37° C sob tensão de 5% de CO₂, tendo como base o trabalho de Wolfers et al., (2001). Logo após este período, as células tumorais foram marcadas com os mesmos anticorpos utilizados nas células sem tratamento (mesmo painel de anticorpos do item 3.6) e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur ou FACSCantoTM II, BD Biosciences).

3.12 Microscopia de fluorescência

Para confirmação da incorporação de Exo pelas células tumorais, optou-se pela realização da técnica de imunofluorescência. Para tanto, as células tumorais da linhagem SK-BR-3 foram plaqueadas concomitantes com Exo sobre lamínulas previamente dispostas em placa de cultura de 6 poços. Também foram plaqueadas células tumorais com mExo previamente marcados com lectinas fluorescentes (*Wheat Germ Agglutinin Conjugates- InvitrogenTM* conjugado com Alexa Fluor 633). Após 8 horas de incubação, os poços foram 2 vezes lavados cuidadosamente com 1mL de PBS e foram acrescidos de 200 µL de DAPI (10 µg/mL) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os poços foram novamente lavados e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos à 4° C. Por fim, realizaram-se mais duas lavagens, e as lamínulas retiradas foram montadas com glicerol-PBS 1:1 em lâminas para microscopia e seladas com esmalte. Estas foram guardadas ao abrigo da luz à 4° C para leitura em Microscópio Confocal da Marca Zeiss, LSM510 e *software* de aquisição e análise Kombi LSM - META FCS no laboratório de Microscopia Confocal da Central Analítica – Instituto de Química – USP. Apesar do microscópio utilizado para captação de imagem ser Confocal, as análises do material foram feitas apenas para a superfície celular, caracterizando assim uma microscopia de fluorescência.

3.13 Separação de linfócitos T

Para a maioria dos experimentos alogênicos, os linfócitos T foram separados das amostras de PBMCs por formação de rosetas com eritrócitos de carneiro, semelhante ao descrito por Saxon et. al. (1976). Hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50mL e centrifugadas a 2.100 rpm durante 10 minutos a 20° C, e a seguir lavadas 2 vezes, com mesma centrifugação, em tampão PBS. Estas hemácias foram tratadas com AET (2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide; Sigma) para mudar a carga elétrica da superfície das hemácias, possibilitando uma maior interação eletrostática com linfócitos T e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0N. Após passagem em filtro de 0,22 μ m (Millipore), 8mL de solução de AET foram acrescentados a cada 2mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 20 a 40 minutos a 37° C. A seguir, as hemácias foram lavadas com tampão PBS, pH 7,2 (centrifugação a 1.800 rpm por 10 minutos), até obtenção de sobrenadante claro e ressuspensas até se obter uma suspensão a 4% em meio com 4% SFB.

Uma suspensão de linfócitos em concentração máxima de 1×10^7 células/ml foi preparada, misturada com soro fetal bovino e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET (preparação AET-SRBC), como descrito anteriormente, numa proporção de 2: 1: 2, centrifugada a 800 rpm, por 5 minutos a 4° C e incubada em gelo por 1 hora. Após a incubação, as células foram novamente ressuspensas e o número de rosetas contado. A suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-paque (2.100 rpm, 4° C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os linfócitos T presentes no *pellet*, no fundo do tubo, formando rosetas com as hemácias de carneiro modificadas, foram recuperados com tampão de lise de hemácias e lavados em meio de cultura (R-10), com centrifugação a 1.300 rpm, durante 10 minutos a 20° C. Os linfócitos T foram ressuspensos em meio R-10, quantificados em câmara de Neubauer, e sua concentração ajustada.

Estas células foram então usadas como respondedoras em ensaios de proliferação celular e liberação de citocinas frente às células SK-BR-3 tratadas ou não com Exo.

Além dessa metodologia, para todos os ensaios autólogos, foi utilizada a separação de linfócitos T CD3⁺ a partir de seleção positiva ou negativa por microesferas magnéticas. Para tal, células mononucleares provenientes de doadores saudáveis, foram contadas e lavadas em PBS-BSA-EDTA (0,5% de BSA e 3mM de EDTA), e então enriquecidos com microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec) anti-CD3 (separação da população total de linfócitos T), e posteriormente magneticamente selecionadas por MACS®-sorting de acordo com as instruções do fabricante. Para análise da pureza das subpopulações isoladas foi realizada citometria de fluxo após alguns procedimentos de separação celular, sendo detectada a pureza $\geq 90\%$. Além da separação por seleção positiva, foram realizadas separações de células CD3⁺, por seleção negativa. Neste caso, as células mononucleares foram enriquecidas com microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec) anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD123 e anti-glicoforina A (marcadores característicos das populações indesejadas para a cultura) e posteriormente magneticamente selecionadas por MACS®-sorting de acordo com as instruções do fabricante.

3.14 Ensaio de linfoestimulação alogênico

As células SK-BR-3 tratadas com iExo e mExo foram irradiadas com 40 Gy e co-cultivadas com linfócitos T alogênicos (células respondedoras) às DCs, que originaram os Exo. Inicialmente, os linfócitos T foram incubados em tampão PBS-BSA 0,5%, contendo 10 μ M de CFSE (Lyons, 2000). A incubação foi realizada a 37° C, no escuro, por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes em R-10 à 800 G. Esses linfócitos T (em uma concentração de 1x10⁵/poço) foram co-cultivados com células SK-BR-3 tratadas ou não com iExo e mExo (concentração 1x10⁴/poço), por um período de 5 dias. Ao final do período de cultura, os linfócitos foram marcados com anticorpos fluorescentes anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 e analisados em Citômetros de Fluxo FACSCalibur ou FACSCanto™II (BD Biosciences).

3.15 Expansão de linfócitos T autólogos

Para a realização dos ensaios linfoestimulação autólogos foi necessário submeter os linfócitos (autólogos ao Exo) à sensibilização prévia por DCs. Assim, inicialmente, os linfócitos T (ou CNAs) foram submetidos a um estímulo primário com DCs autólogas, pulsadas ou não com antígenos tumorais. Esse estímulo primário foi realizado por 7 dias, em placas de 24 poços, mantendo uma proporção 1 DC : 10 linfócitos TCD3⁺. Essas co-culturas foram suplementadas no dia zero da cultura com IL-7 (5 ng/mL) e ao terceiro dia com IL-2 (0,5 ng/mL). Após os 7 dias de cultura, os linfócitos (ou CNAs) foram coletados e incubados com monócitos autólogos pulsados ou não com os mesmo antígenos utilizados no primeiro estímulo, na proporção de 1 monócito para 10 linfócitos. A escolha em utilizar, para o re-estímulo, monócitos como células estimuladoras em vez de DCs, advém do fato de que, repetidas estimulações com DCs poderiam resultar na deleção de linfócitos T antígeno-específicos por morte celular induzida por ativação (AICD) (Mehrotra *et al.*, 2003). Além do mais, Ho *et al.* (2006) mostraram que, após o *priming* de linfócitos T *naïve* com DCs, a re-estimulação desses linfócitos com monócitos pulsados com o peptídeo para o qual os pesquisadores queriam expandir os clones de LT, foi, de fato mais efetiva do que a re-estimulação com DCs. Essas co-culturas foram suplementadas com as citocinas IL-7 (5 ng/mL) no dia zero e ao terceiro dia com IL-2 (0,5 ng/mL). Após um período de 7 dias de cultura, os linfócitos (ou CNAs) foram coletados, selecionados e incubados em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 10 µM de CFSE (Lyons, 2000). A incubação foi realizada a 37° C, no escuro, por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes em R-10 gelado à 800 G. Então, estas células foram co-cultivadas com células tumorais tratadas com Exo para avaliação da resposta proliferativa desses linfócitos pelo método do CFSE (Lyons, 2000). Decorridos 5 dias de cultura, os linfócitos foram marcados com anticorpos fluorescentes anti-CD4 e anti-CD8 e analisados em Citômetros de Fluxo da BD Biosciences FACSCalibur ou FACSCantoTMII, utilizando-se os *softwares* CellQuest ou FACS DIVA, respectivamente. Em alguns ensaios, após 2 dias de co-cultura, os linfócitos foram coletados e marcados com anticorpo monoclonal anti-CD69, para avaliar o estado de ativação destas células frente às células tumorais tratadas com Exo.

Para a análise dos dados de proliferação com CFSE, foi criado um índice de proliferação, calculado da seguinte maneira:

Média geométrica da intensidade de fluorescência de LT cultivados isoladamente (controle)

Média geométrica da intensidade de fluorescência das co-culturas

Este índice permite mensurar a queda na intensidade de fluorescência das células marcadas, que seria maior quanto maior o número de divisões. Este fator não seria considerado se apenas se avaliasse a percentagem de células com fluorescência abaixo das de células controle.

O protocolo acima mencionado foi baseado nos trabalhos realizados por Mehrotra *et al.*, 2003 e Ho *et al.* (2006), mas com algumas modificações.

3.16 Avaliação da citotoxicidade celular

Este ensaio foi realizado para determinar a eficácia da incorporação dos Exo nas células SK-BR-3 em torná-las alvo da citotoxicidade de linfócitos T autólogos (após a sensibilização como descrito no item anterior).

Este protocolo foi baseado no trabalho de Marcusson-Ståhl e Cederbrant (2003), mas com algumas modificações. Resumidamente, as células tumorais foram coletadas e incubadas em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 10 μ M de CFSE, por 15 minutos a 37° C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes em R-10 gelado à 800 G. Após serem coradas, estas células foram tratadas com Exo e co-cultivadas com linfócitos T autólogos, em diferentes proporções (1 : 16, 1 : 8 e 1 : 4) por 4 horas. Decorrido este período, as células foram lavadas com PBS e coradas com Iodeto de Propídeo (PI) 100 μ g/mL (Invitrogen), por 15 minutos a temperatura ambiente. Após marcação, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Sabe-se que o PI penetra nas células lisadas ou em processo de lise, assim, as células tumorais duplamente marcadas (CFSE+/PI+) foram as células que sofreram citotoxicidade por linfócitos T.

3.17 Detecção da produção de citocinas por ELISA

Foram realizadas as dosagens das citocinas IL-10 e IFN- γ do sobrenadante das co-culturas das células SK-BR-3 (tratadas ou não com Exo) com linfócitos T

alogênicos através da técnica de ELISA, utilizando os *kits* Opteia para citocinas (BD). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International) foram sensibilizadas com 100 µL por poço de anticorpo de captura diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH= 9,5), e incubadas por uma noite. Após 3 lavagens com 300 µL/poço de tampão de lavagem para ELISA (PBS-Tween 0,05%), as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão de bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para a curva-padrão das citocinas, foram incubadas duplicatas de 50 µL/poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição) das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e da curva-padrão foi de 2 horas em temperatura ambiente. Após 5 lavagens, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada por 7 vezes, 50 µL/poço de estreptoavidina foram adicionados e houve nova incubação por 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

3.18 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX

Sobrenadantes das co-culturas de um experimento foram submetidos ao ensaio de detecção da produção das citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ , pela técnica de BIOPLEX. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Multiplex, Millipore).

3.19 Detecção da produção de citocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array – CBA)

As dosagens de citocinas no sobrenadante das co-culturas de linfócitos T autólogos ao Exo utilizados para tratar as DCs foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array*, utilizando-se o *BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit* (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17A (BD Bioscience). Em resumo, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do *kit* foram incubados com microesferas

de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações de 3 horas no escuro à temperatura ambiente, foi acrescido 1 mL da solução de lavagem e centrifugado por 5 minutos a 200 G. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendido em 300 µL da solução de lavagem e adquiridas em citômetro de fluxo, FACScanto II (BD Biosciences). Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando FCAP Array™ Software (BD Biosciences).

3.20 Determinação do número de células produtoras de IFN- γ pela técnica de Elispot

O número de células secretoras de IFN- γ foi determinado pela reação de ELISA modificada para formação de pontos (Elispot - BD Bioscience). Inicialmente, microplacas de 96 poços com fundo de *Immulon* foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti- IFN- γ , diluído em PBS, e incubadas *overnight* a 4° C. Após 2 lavagens com a solução bloqueio (R-10), os sítios livres foram bloqueados com R-10 e as placas foram incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período, a solução bloqueio foi descartada e foram adicionadas às placas células tumorais tratadas com Exo e linfócitos T autólogos (às nanovesículas) na proporção 1:10. As células foram então incubadas por aproximadamente 48 horas à 37° C em estufa de 5% CO₂. Posteriormente, as placas foram lavadas 2 vezes com água deionizada e 3 vezes com PBS 10% SFB. Em seguida foi aplicado o anticorpo monoclonal biotinilado, com incubação por 2 horas a 37° C. Após as lavagens, foi adicionado streptavidina-peroxidase diluída em PBS 10% SFB, seguida de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS Tween 20 a 0,05% e 2 vezes com PBS e, em seguida, reveladas com substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC Substrate Reagent Set for ELISPOT – BD Biosciences). A leitura da reação foi realizada no Analisador de AID ELISpot e *software* AID Elispot Reader, versão 6.0, com a colaboração do Prof. Dr. Éspér Kallas e da Dra. Karina Carvalho do LIM60 da Faculdade de Medicina da USP.

3.21 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para análise da expressão de SOCS3

3.21.1 Extração do RNA tumoral

Cerca de 2×10^5 linfócitos T autólogos co-cultivados por 48 horas com células tumorais SK-BR3, tratadas com Exo, tiveram seu RNA extraído pelo kit de extração RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), como recomendado pelo fabricante. Em seguida, foram armazenadas a -80°C para posterior quantificação pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 a 260nm. A integridade do RNA extraído foi avaliada pela visualização de duas bandas fortes, correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais 18S e 28S, após eletroforese em gel de agarose 1%.

3.21.2 Obtenção do DNA complementar

Para obtenção do cDNA (DNA complementar), cerca de 1 μg do RNA extraído foi submetido à transcrição reversa num volume final de 20 μL , usando a enzima transcriptase reversa SuperScriptTM III (Invitrogen) (200 U/ μL). O RNA foi diluído em 11 μL de água DEPC, com adição de 1 μL de oligo(dT)₁₈ *primer* (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos, seguido de incubação a 25°C por 10 minutos. Durante este período, foi acrescentado, por amostra, uma mistura de 8 μL contendo 4 μL de tampão (5X), 2 μL de *mix* de dNTPs (2,5 mM), 1 μL de DTT (0,1M) e 1 μL da enzima. A reação foi incubada a 42°C por 1 hora e 15 minutos e a 70°C por 15 minutos.

3.21.3 PCR quantitativo

Pares de oligonucleotídeos iniciadores exônicos, para os genes SOCS3 foram desenhados com base em seqüências referências depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio do software PRIMER 3 (frodo.wi.mit.edu). As seqüências dos primers desenhados foram: F5' – GCCACCTACTGAACCCTCCT – 3' e R5' – ACGGTCTTCCGACAGAGATG -3'.

Para as reações de qPCR das amostras de linfócitos T foram adicionados 6,25 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied), 4,25 μL de água ultrapura

autoclavada, 0,375 µL de cada iniciador (10 pmol/µL) e 1 µL de cDNA (na diluição 1:100). As condições para a reação foram: 95 °C por 10 minutos para a ativação da enzima AmpliTaq Gold DNA Polimerase presente no SYBR mix, 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60° C por 1 minuto, seguido da curva de dissociação (95° C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e 95° C por 30 segundos). A reação de qPCR foi realizada no equipamento Stratagene Mx3000P QPCR System e aquisição dos resultados pelo *software* MxPro™ 3.0.

A expressão relativa dos gene alvo foi analisada pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001), na qual o CT=valor limiar de fluorescência; $\Delta CT = CT$ do gene alvo - CT dos genes *house-keepings* (β -actina); $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ do gene alvo nas amostras - ΔCT do gene alvo nos controles. Por fim, calcula-se o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se, assim, a expressão relativa de determinado gene de interesse. Os controles utilizados nos cálculos referem-se aos grupos de linfócitos sensibilizados, mas não estimulados nas co-culturas com células tumorais. Este método parte do princípio de que a eficiência da reação de amplificação do gene alvo deve ser igual à do gene constitutivo, ambas próximas de 100%.

3.22 Análises estatísticas

Os dados obtidos quanto à fenotipagem de monócitos e células dendríticas foram inicialmente analisados quando a homogeneidade da variância, utilizando-se o Teste de Bartlett (Zar JH, 1999). Somente após este teste, as amostras foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, caso apresentassem homocedasticidade. Caso contrário, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn foi usado. Os resultados cuja distribuição foi normal foram expressos pela média, enquanto, os demais foram expressos pela mediana.

Para resultados de MFI com mistura de fluorocromo, foram realizados dois testes. Primeiro foi efetuado o teste qui-quadrado para criação da MFI relativa de DCs em relação aos monócitos, seguido do teste de t pareado, para análise comparativa entre iDCs e mDCs, sendo neste respeitado as premissas estatísticas para as análises paramétricas. Os resultados da imunofenotipagem de exossomos

foram testados quanto à homogeneidade das variâncias (Teste de F), seguido da análise pelo teste de t, caso apresentassem homocedasticidade, ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para a análise do número de células produtoras de citocina por Elispot, as amostras foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Todos os testes neste relatório foram realizados considerando o nível de significância de $\alpha=0,05$ (Zar JH, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das células e nanovesículas utilizadas

4.1.1 Obtenção e caracterização das células dendríticas a partir de monócitos

A partir de PBMC foram separadas células aderentes em plástico, as quais são predominantemente monócitos e, portanto, foram denominadas como monócitos. As células dendríticas foram, então, originadas a partir desses monócitos, de doadores saudáveis, os quais foram tratados com GM-CSF e IL-4 por 5 dias para obtenção de células dendríticas imaturas. No 5º dia de cultura as DCs imaturas foram ativadas com TNF- α e analisadas após 48 horas, por citometria de fluxo.

Para análise fenotípica em todos os grupos experimentais foram feitas quádruplas marcações, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Marcadores de superfície utilizados na fenotipagem de DCs

Tubos	Marcadores			
	FITC	PE	PE-Cy5	APC
1	CD14	CD11c	CD86	HLA-DR
2	<i>linhagens*</i>	CD11c	CD123	HLA-DR
3	<i>linhagens</i>	CD1a	CD11c	HLA-DR
4	<i>linhagens</i>	CD80	CD86	HLA-DR
5	<i>linhagens</i>	CD40	CD83	HLA-DR

* *linhagens* correspondem às marcações com CD3, CD14, CD19 e CD56 (todos em FITC)

FONTE: Romagnoli (2012)

Este painel de anticorpos permite que a análise fique mais fina e mais restrita a uma população que se aproxima do perfil de iDCs e mDCs. Este mesmo painel foi utilizado para monócitos, mas ao invés de *linhagens*, utilizou-se CD14 para todos os tubos.

Após marcação, todas as amostras submetidas à citometria de fluxo foram analisadas dentro do *gate* R1, definido por tamanho e granulosidade, conforme ilustrado nas figuras 2, 3 e 4, pois dessa forma, foram excluídos os linfócitos (*gate* R2) da análise. A partir do *gate* R1, um terceiro *gate* (R3) foi construído, tendo como parâmetro a marcação positiva para HLA-DR e negativa para *linhagens* (denominação de *linhagens negativas*). Assim, as demais análises realizadas para iDCs e mDCs foram dentro do *gate* R3, onde as células já eram *linhagens negativas* e HLA-DR positivas (Figuras 2 e 3). Para monócitos o *gate* R3 representava as

células CD14 positivas, pois esta é a população que dará origem às populações de DCs (Figura 4).

Figura 2 - Fenótipo da população de células dendríticas imaturas (iDCs) originadas a partir de monócitos de doadores saudáveis.

As iDCs foram geradas a partir de monócitos tratados com GM-CSF e IL-4, por 5 dias. Gráficos são demonstrativos das estratégias de análises. (A) *gate* R1, refere-se à população de iDC, *gate* R2, refere-se à população de linfócitos. Notar que as iDCs estão localizadas, predominantemente, na região de células grandes e mais granulosas. (B) *gate* R3, refere-se à população de células *linhagens* negativas/HLA-DR+. (C-G) referem-se as análises realizadas dentro do *gate* R3.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 3 - Fenótipo da população de células dendríticas maduras (mDCs).

As mDCs foram geradas a partir de monócitos tratados com GM-CSF e IL-4, por 7 dias. Ao 5º dia de cultura foi adicionado TNF- α , para ativação da população de DCs. Gráficos são demonstrativos das estratégias de análises. (A) *gate* R1, refere-se à população de mDCs, *gate* R2, refere-se à população de linfócitos. Notar que as mDCs estão localizadas, predominantemente, na região de células grandes e mais granulosas. (B) *gate* R3, refere-se à população de células *linhagens negativas*/HLA-DR+. (C-G) referem-se as análises realizadas dentro do *gate* R3.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 4 - Fenótipo da população de monócitos obtidos a partir de doadores saudáveis.

Gráficos são demonstrativos das estratégias de análises. (A) *gate* R1, refere-se à população de monócitos, *gate* R2, refere-se à população de linfócitos. Notar que os monócitos estão localizados na região de células menores e menos granulosas. (B) *gate* R3, refere-se à população de células CD14+. (C-G) referem-se as análises realizadas dentro do *gate* R3.

FONTE: Romagnoli (2012)

Definidos os *gates* de análise, foi computada a porcentagem de células dentro do *gate* R1. Como pode ser observado na Figura 5, não houve diferenças significativas entre a frequência de células no *gate* R1, entre monócitos, iDCs e mDCs. Apesar da frequência de células neste *gate* entre as DCs parecer ser menor, essa diferença não foi significativa. Dentro desse mesmo *gate* foram analisadas as porcentagens de células positivas para CD14 e HLA-DR, bem como a Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) de cada molécula (Figuras 6 e 7). Como pode ser observado na figura 6, o processo de diferenciação entre as células submetidas à cultura para geração de iDCs e mDCs provocou uma queda na frequência de células CD14+ ($p < 0,0001$). Com relação ao HLA-DR, pode-se verificar uma homogeneidade maior da frequência de células expressando este marcador entre iDC e mDC em relação aos monócitos, no entanto, a intensidade de marcação parece ser mais heterogênea entre DCs (Figura 7).

Figura 5 - Porcentagem células dentro do gate baseado no tamanho (SSC) e na granulosidade (SSC) dos respectivos tipos celulares (R1).

A partir de PBMCs, foram obtidas as células aderentes, que em sua maioria são monócitos. Estes foram diferenciados em iDCs, após tratamento com IL-4 e GM-CSF, por 5 dias. As mDCs foram obtidas no 7º dia de cultura, em presença de IL-4 e GM-CSF e acrescidas no 5º dia de $\text{TNF-}\alpha$, para ativação. ANOVA ($p=0,36$).

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 6 - Frequência células CD14⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD14 em Monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro do *gate* baseado em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (A) Histograma representativo da expressão de CD14 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD14⁺; ANOVA ($p < 0,001$), seguido do Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. (C) Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) da molécula CD14; Kruskal-Wallis ($p = 0,02$), seguido do Teste de Dunn para comparações múltiplas. * representa diferença significativa com $p < 0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 7 - Frequência células HLA-DR⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula HLA-DR em Monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro do *gate* baseado em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (A) Histograma representativo da expressão de HLA-DR nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células HLA-DR⁺; ANOVA ($p = 0,16$). (C) Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) da molécula HLA-DR; ANOVA ($p = 0,89$).

FONTE: Romagnoli (2012)

Devido ao fato de algumas moléculas terem sido analisadas com anticorpo específico, mas com fluorocromos diferentes, houve a necessidade de ajustar a MFI destas amostras, para que então elas pudessem ser comparadas. Assim, foi realizada uma relação entre MFI de cada marcador entre as DCs pela MFI dos

mesmos marcadores entre os monócitos, no mesmo experimento, o que foi denominado de MFI relativa.

A análise da molécula co-estimuladora CD80, demonstrou aumento significativo em mDCs ($p=0,0046$), tanto para a frequência de células ($p<0,0001$) (Figura 8B), quanto para a MFI relativa (Figura 8C) em relação aos monócitos. Também foram observadas diferenças significativas da MFI relativa entre monócitos e iDCs. ($p=0,0046$) (Figura 8C). No entanto, não foram observadas diferenças entre iDCs e mDCs. Já as células CD86⁺ tiveram uma frequência mais homogênea entre as três populações (Figura 9B). Quando foi avaliada a expressão desta molécula, observou-se um aumento gradativo ao longo da diferenciação/ativação, o qual foi significativo entre monócitos e mDCs (Figura 9C). Outra molécula envolvida na ativação linfocitária, CD83, que é expressa em DCs ativadas, estava presente em mais de 60% da população de monócitos, sendo esta frequência maior que a encontrada nas DCs ($p=0,0046$) (Figura 10B). Entretanto, estudos em andamento em nosso laboratório apontam para o fato, de que, o modo pelo qual o sangue é colhido no doador pode interferir na expressão desta molécula. Já a MFI relativa de CD83, tendeu a um aumento em algumas mDCs, mas este não foi significativo (Figura 10C). Também não foram observadas diferenças significativas na análise da molécula CD40 (Figura 11).

Figura 8 - Frequência células CD80⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD80 em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/*linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD80 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD80⁺; ANOVA ($p<0,0001$) seguido do Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. (C) Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) da molécula CD80. Testes Qui-quadrado ($p=0,0046$) e t pareado ($p=0,12$). * representa diferença significativa com $p<0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 9 - Frequência células CD86⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD86 em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD86 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD86⁺. Kruskal-Wallis ($p=0,93$). (C) Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) da molécula CD86. Testes Qui-quadrado ($p=0,15$ e $p=0,03$) e t pareado ($p=0,11$). * representa diferença significativa com $p<0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 10 - Frequência células CD83⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD83 em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD83 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD83⁺; ANOVA ($p=0,0044$), seguido pelo teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas. (C) Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) da molécula CD83; Testes Qui-quadrado ($p=0,4795$) e t pareado ($p=0,097$). * representa diferença significativa com $p<0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 11 - Frequência células CD40⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa da molécula CD40 em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR+/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD40 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD40⁺; Kruskal-Wallis ($p=0,19$). (C) Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) da molécula CD40. Qui-quadrado ($p=0,47$ e $p=0,15$) e t pareado ($p=0,16$).

FONTE: Romagnoli (2012)

Quanto aos marcadores envolvidos na diferenciação de linhagens, a molécula CD11c, característica de células dendríticas mielóides, apresentou maior intensidade de marcação nas mDCs que em monócitos (Figura 12B). As células CD1a⁺ apresentaram baixa frequência, sendo praticamente ausentes em monócitos e aumentando entre as DCs ($p=0,03$) (Figura 13B). Apesar do maior número de células CD1a⁺ nas DCs, este marcador apresentou-se baixamente expresso em todas as três populações celulares (Figura 13C). Quanto à população CD123⁺ ficou evidente o decaimento dessa população após tratamento com IL-4 e GM-CSF ($p<0,0001$) (Figura 14B). No entanto, na intensidade de marcação não houve diferenças significativas entres as populações celulares (Figura 14C).

Figura 12 - Frequência células CD11c⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD11c em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD11c nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD11c⁺; ANOVA ($p=0,11$). (C) Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) da molécula CD11c. Kruskal-Wallis ($p=0,024$), seguido teste de Dunn para comparações múltiplas. * representa diferenças significativas com $p<0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 13 - Frequência células CD1a⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD1a em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD1a nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD1a⁺; Kruskal-Wallis ($p=0,039$), seguido teste de Dunn para comparações múltiplas. (C) Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) da molécula CD1a. Resultados apresentados pela mediana. Kruskal-Wallis ($p=0,19$). * representa diferenças significativas com $p<0,05$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 14 - Frequência células CD123⁺ e Intensidade Mediana de Fluorescência da molécula CD123 em monócitos, iDCs e mDCs.

Análise realizada dentro dos *gates* CD14⁺ (Monócitos) e HLA-DR⁺/ *linhagens negativas* (iDCs e mDCs). (A) Histograma representativo da expressão de CD123 nas três populações de células. Linha preta representa os Monócitos, linha vermelha as iDCs e linha azul as mDCs. (B) Porcentagem de células CD123⁺; ANOVA ($p=0,0001$), seguido teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas. (C) Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) da molécula CD123. Kruskal-Wallis ($p=0,33$). *** representa diferenças significativas com $p<0,0001$.

FONTE: Romagnoli (2012)

Objetivando uma melhor compreensão do processo de diferenciação/ativação, foi também realizada análise de rendimento celular (Figura 15). Em 6 experimentos foram realizadas contagens de monócitos, iDCs e mDCs viáveis, pelo método de exclusão por *Azul de Trypan*. Levando em consideração que as PBMCs plaqueadas equivalem a 100%, após 2 horas de aderência, foi observada recuperação de aproximadamente 14% de células aderentes (monócitos). Quando foi avaliado o rendimento das populações de iDC e mDC, 4% e 3,7%, respectivamente, esses valores parecem ser baixos em relação ao total de células plaqueadas, no entanto, quando levamos em consideração o número inicial de células que originaram estas culturas, isto é, o número de monócitos, o processo de diferenciação gerou um rendimento de aproximadamente 29% em iDC. Quando foi avaliada a população de mDC, foi verificado 93% de rendimento em relação à população de iDC, após tratamento destas com TNF- α .

Figura 15 - Rendimento das culturas de monócitos, iDCs e mDCs.

Cada população foi coletada e contada pelo método de exclusão em Azul de Trypan. As células viáveis de cada tipo celular foram computadas e comparadas com a população de origem, isto é, monócitos em relação às PBMCs, iDCs em relação aos monócitos e mDC em relação às iDCs.

FONTE: Romagnoli (2012)

Por fim, para uma análise mais completa e também comparativa, foi realizado um experimento avaliando-se a expressão dos marcadores de superfície comumente encontrados em exossomos de DCs. Como pode ser observado na figura 16, as tetraspaninas CD9 e CD81 são mais expressas em mDCs, bem como a molécula ICAM-I/CD54. Já a integrina CD18 é menos expressa na mDCs em relação as iDCs e monócitos.

Figura 16 - Expressão dos marcadores CD9, CD81, CD54 e CD18 em monócitos, iDCs e mDCs.

O *gate* de análise foi baseado no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) da população em questão. Os Histogramas são representativos do fenótipo observado na população de monócitos (linha preta), iDCs (linha vermelha) e mDCs (linha azul). As moléculas de superfície analisadas encontram-se identificadas em cada histograma.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.1.2 Caracterização de iExo e mExo

Os exossomos foram obtidos a partir de DCs. Para tal DCs foram diferenciadas a partir de 5×10^7 PBMCs plaqueadas e o sobrenadante desta cultura foi centrifugado 3 vezes para remoção de células e “debris” celulares e submetido à ultracentrifugações. Ao fim da ultracentrifugação o *pellet* foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS e submetido a filtração com membrana de 0,22 μ m para esterilização do material. Após esterilização do material, este foi aliquoteado e estocado à -80° C. Uma alíquota foi utilizada para quantificação de proteína pelo BCATM Protein Assay Kit (Pierce). Como demonstrado na Figura 17, não foram observadas diferenças significativas entre os conteúdos protéicos originados de iDCs e mDCs ($p=0,3479$).

Figura 17 - Quantificação de proteínas na suspensão de exossomos de DCs.

Os exossomos foram obtidos de iDCs e mDCs diferenciadas a partir de 5×10^7 PBMCs plaqueadas. Os sobrenadantes destas culturas de DCs foram submetidos a diferentes centrifugações para remoção de células e debris celulares. Após duas ultracentrifugações, os exossomos precipitados foram ressuspensos em PBS, esterilizados e quantificados pelo método de detecção de proteína - BCATM Protein Assay Kit (Pierce). Os resultados foram expressos pela quantidade de proteínas obtidas por 10^6 células.

FONTE: Romagnoli (2012)

Para análise, 2 μ g de Exo (iExo ou mExo) foram adicionada a $1,5 \times 10^5$ microesferas paramagnéticas, para fenotipagem de cada marcador de superfície avaliado. Após acoplamento (24h de incubação, sob agitação horizontal), as análises foram realizadas em citômetro de fluxo. A figura 18A mostra os *gates* definidos por FSC e SSC e todas as análises foram realizadas no *gate* R1 (que contem as microesferas isoladas). O *gate* R2 refere-se a agregados de 2

microesferas e o *gate* R3 à agregados de 3 microesferas. A figura 18B ilustra a relação quantidade das microesferas isoladas com os agregados. Foram realizadas 8 fenotipagens de iExo e 9 de mExo. Como demonstrado na figura 18C e D, tanto no acoplamento com microesferas marcadas com anti-MHC-II (microesferas PrepII) quanto com microesferas marcadas com anti-MHC-I (microesferas PrepI), foi observada média de 70% de microesferas dentro do *gate* de análise. Na figura 18C e D estão representadas apenas as porcentagens dentro do *gate* R1 com mExo, uma vez que este foi semelhante ao iExo.

Figura 18 - Estratégia de análise dos exossomos por citometria de fluxo

Exosmos obtidos de iDCs e mDCs (2 μ g) foram acoplados por 24 horas com microesferas paramagnéticas (Dynabeads M-450) para análise de alguns marcadores de superfície, por citometria de fluxo. (A) *Dot-plot* e (B) Histograma representando as microesferas acopladas com Exo. As microesferas podem ser determinadas baseando-se nos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), apresentando-se uma única vez (R1), duplamente acopladas (R2) e triplamente acopladas (R3). O *gate* R1 foi utilizado para todas as análises. (C) Frequência de microesferas paramagnéticas marcadas com anti-MHC-I no *gate* de análise, R1. (D) Frequência de microesferas paramagnéticas marcadas com anti-MHC-II no *gate* de análise R1.

FONTE: Romagnoli (2012)

As microesferas marcadas com anti-MHC-II foram utilizadas para detecção das moléculas CD11c, CD1a, CD123, HLA-ABC, CD86, CD80, CD83, CD40, CD9, CD81, CD54 e CD18 nos Exo. Já as microesferas marcadas com anti-MHC-I foram utilizadas para análise de HLA-DR.

A análise fenotípica demonstrou que os exossomos originados de mDC apresentaram maior frequência dos marcadores que os originados de iDCs (dados não mostrados). Por essa razão as demais análises referentes à fenotipagem foram feitas com mExo. Como demonstrado na Figura 19, as moléculas mais comumente encontradas nos mExo, foram HLA-ABC, HLA-DR, CD86, CD11c, CD54, CD18, CD9 e CD81, apresentando variações em sua intensidade de expressão.

Figura 19 - Imunofenotipagem de mDCs por citometria de fluxo.

Exossomos de DCs foram acoplados com microesferas paramagnéticas marcadas com anti-MHC I ou anti-mHC II. Após acoplamento, os exossomos foram incubados por 30 minutos (4° C no escuro) como anticorpos monoclonais para as moléculas HLA-ABC, HLA-DR CD86, CD11c, CD54, CD18, CD9 e CD81, e analisados em citômetro de fluxo. Na figura, histogramas representativo dos marcadores de superfície encontrados em mExo. A linha vermelha representa a marcação específica e a linha preta a marcação com o isótipo controle IgG1k ou IgG2a.

FONTE: Romagnoli (2012)

Como demonstrado na figura 20, que mostra a média dos experimentos com mExo em relação à MFI, observa-se maior MFI das moléculas envolvidas na ativação linfocitária, como HLA-ABC ($p=0,0216$), CD86 ($p=0,0047$), que seu isótipo controle IgG1k e também da molécula HLA-DR em relação ao seu isótipo controle IgG2a, entretanto, este aumento não foi significativo.

Figura 20 - Presença de moléculas envolvidas com ativação linfocitária nos exossomos obtidos de mDCs (mExo).

mExo foram acoplados com microesferas paramagnéticas e então marcados com anticorpos específicos para algumas moléculas envolvidas com ativação linfocitária. Após marcação os mesmos foram avaliados por citometria de fluxo. As barras do gráfico representam a Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas HLA ABC, CD80, CD86, CD83, CD40 e HLA-DR. A linha pontilhada azul representa a média da MFI do isotipo IgG1k e a linha pontilhada vermelha representa a média do isotipo IgG2a, controle apenas de HLA-DR. * representa diferenças significativas com $p < 0,05$, em relação ao isotipo controle.

FONTE: Romagnoli (2012)

Também houve diferenças na detecção de moléculas envolvidas com adesão celular, como integrinas e tetraspaninas (Figura 21), sendo observada a presença de CD11c ($p=0,0079$), CD18 ($p= 0,0068$) e CD81 ($p=0,0027$), mas também de CD9 ($p=0,0321$).

Figura 21 - Presença de moléculas envolvidas com adesão celular nos exossomos obtidos de mDCs (mExo).

mExo foram acoplados com microesferas paramagnéticas e então marcados com anticorpos específicos para algumas moléculas envolvidas com adesão celular. Após marcação os mesmos foram avaliados por citometria de fluxo. As barras do gráfico representam a Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas CD11c, CD54, CD18, CD9, CD81, CD1a e CD123. A linha pontilhada azul representa a média da MFI do isótipo IgG1k. * representa diferenças significativas com $p < 0,05$, em relação ao isótipo controle.

FONTE: Romagnoli (2012)

Com o intuito de complementar os resultados, realizou-se também a análise das nanovesículas através de microscopia eletrônica de transmissão. Para tal análise foi realizada em parceria da Profa. Dra. Élia Garcia Caldini e do Dr. Marcelo Alves Ferreira do Laboratório de Biologia Celular (LIM-59) da FMUSP.

Como demonstrado na figura 22, a constituição do *pellet* formado pós-ultracentrifugação apresentou vesículas com bicamada lipídica de diferentes tamanhos. A maioria das vesículas detectadas possui morfologia semelhante às vesículas de compartimentos endossômicos, tendo uma variação de tamanho de 30 à 200 nm. Variação esta que inclui o tamanho esperado para exossomos (30-100 nm).

Figura 22 - Fotomicrografia das nanovesículas purificadas/enriquecidas no sobrenadante de mDCs.

O *pellet* obtido da ultracentrifugação do sobrenadante de cultura de DCs maduras foi processado e analisado por microscopia eletrônica de transmissão. As vesículas, de modo geral, possuem uma variação de tamanho de 30 à 200nm. (A) Foto em menor aumento (24.000x). (B) Foto em aumento de 39.000X. (C e D) Foto em maior aumento (93.000X).

FONTE: Romagnoli (2012)

4.1.3 Fenotipagem da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3 e análise para detecção de micoplasma.

Antes de analisar o efeito do tratamento com Exo sobre as células tumorais, foi realizada fenotipagem das células da linhagem SK-BR-3 por citometria de fluxo (Figura 23). As células da linhagem SK-BR-3 foram gentilmente cedidas pela Dra. Anamaria Camargo do Instituto Ludwig- SP. As moléculas escolhidas para a análise foram as mesmas usadas para caracterização das células dendríticas e dos monócitos.

Estas células expressam o antígeno Her-2/neu, o qual é sabidamente hiperexpresso nesta linhagem, bem como, as tetraspaninas CD9 e CD81 (Figura

23). Não foram observadas a presença de quaisquer moléculas envolvidas na ativação de linfócitos T, nem de CD11c, CD1a ou CCR7.

Figura 23 - Fenotipagem da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3

As células tumorais foram fenotipadas com anticorpos específicos para a maioria dos marcadores comumente encontrados em DCs. Na ordem vêm-se *Dot-plot* mostrando tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células viáveis, assim como o *gate* de análise. Os demais histogramas referem-se as análises das diferentes moléculas de superfície, devidamente identificadas abaixo de cada gráfico. A linha preta representa as células marcadas com o isotipo controle e em a linha vermelha as células que foram marcadas com anticorpo específico.

FONTE: Romagnoli (2012)

Além da análise fenotípica, também foi verificada se as células não estavam contaminadas por micoplasma, antes da realização dos ensaios funcionais. Como

demonstrado na figura 24, as células tumorais SK-BR-3 não apresentaram banda de 270 pb, correspondente ao esperado para contaminação positiva por micoplasma.

Figura 24 - Ausência de Contaminação por Micoplasma nas células SK-BR-3.

Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1% para analisar se havia contaminação por micoplasma nas células da linhagem tumoral SK-BR-3. O fragmento esperado de contaminação era de 270pb e encontra-se representado na canaleta 2 (CRL+). A canaleta 3, representa o controle negativo (CRL). A canaleta 4, representa a amostra proveniente das células tumorais SK-BR-3. M: marcador de peso molecular.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2 Ensaios Funcionais

4.2.1 Ensaio para verificar a capacidade de modificação fenotípica celular pelo tratamento com Exossomos obtidos de DCs.

Como descrito na introdução desse trabalho, já foi evidenciado que DCs são capazes de capturar Exo, originados de outras DCs e, após esse evento, passaram a expressar as moléculas então presentes nas nanovesículas. Assim, antes de testarmos a possível incorporação de moléculas presentes no Exo de DCs pelas células tumorais, resolveu-se testar se Exo de DCs maduras (allogênicos) teriam alguma ação sobre a diferenciação de DCs, originadas de monócitos. Para tal, todos

os monócitos utilizados foram tratados nos dias 0 e 4 com GM-CSF e IL-4. Como demonstrado na tabela 3, no grupo 1 as células foram ativadas com TNF- α ao 5º dia de cultura. No grupo 2 as células foram tratadas com mExo (300 μ g) nos dias 0 e 4 e não foram ativadas com TNF- α .

Tabela 3 - Delineamento experimental do tratamento com mExo sob monócitos

Grupo	Tratamento	dia da administração
1	TNF- α (50ng/mL)	5
2	mExo (300 μ g)	0 e 4

FONTE: Romagnoli (2012)

Na análise por microscopia óptica no 4º dia de cultura ficou evidente a diferença morfologia entre o grupo 2, tratado uma única vez com mExo (Figura 25B), e o grupo 1, sem mExo (Figura 25A). A análise morfológica sugere um perfil de células dendríticas maduras mesmo sem a ativação com TNF- α . Apesar da imagem não tão nítida, as células tratadas uma vez com mExo apresentaram um aumento de tamanho, formação de “grumos” com células apresentando dendritos, características estas comumente apresentadas em culturas de DCs ativadas, realizadas em nosso laboratório.

Figura 25 - Efeito do tratamento com mExo sobre a morfologia de iDCs.

Fotomicrografia ao 4º dia de cultura de monócitos obtidos de doadores saudáveis diferenciados em DCs através do tratamento de GM-CSF e IL-4. (A) Tratamento somente com GM-CSF e IL-4 no dia 0. (B) Tratamento com GM-CSF, IL-4 e 300 μ g de mExo no dia zero. Análise microscópica (objetiva 20x) demonstra que o tratamento com mExo, resultou na geração de células com aspecto morfológico de DCs ativadas, as quais apresentaram aumento de tamanho e presença de dendritos. Além disso, as células apresentavam-se agrupadas, característica esta comum às culturas de DCs ativadas por TNF- α .

FONTE: Romagnoli (2012)

As análises fenotípicas foram realizadas ao final de sete dias de cultura por citometria de fluxo e os resultados foram expressos em intensidade mediana de fluorescência (MFI) (Tabela 4). O grupo 1, tratado com TNF- α no 5º dia de cultura (sem mExo), foi utilizado como controle positivo de maturação/ativação.

Tabela 4 - Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) dos marcadores de superfície nas DCs após tratamento ou não com mExo alogênicos.

Grupos	MFI dos marcadores de superfície									
	CD14	CD80	CD86	CD123	CD11c	CD83	CD1a	CD40	HLA-ABC	HLA-DR
1	1,94	360,28	280,83	51,18	313,82	5,94	5,03	3,14	72,68	33,15
2	3,69	635,17	434,75	25,29	278,21	14,2	4,43	6,12	153,76	38,66

FONTE: Romagnoli (2012)

Esses resultados demonstram que apenas o tratamento com mExo (grupo 2) já foi suficiente para induzir mudança no fenótipo, compatível com maturação/ativação das DCs. As células do grupo 2 apresentaram maior expressão de CD80, CD86, CD40, HLA-ABC e HLA-DR que o grupo controle ativado com TNF- α . Chama a atenção o aumento das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86.

4.2.2 Incorporação de Exo pelas células da linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.

Após obtenção, quantificação, fenotipagem e verificação da capacidade dos mExo de alterar o fenótipo de monócitos/iDCs, foram iniciados os experimentos de tratamento das células tumorais com as nanovesículas, os quais foram avaliados por citometria de fluxo.

A concentração de partida foi 13,75 μ g, testada em 2 períodos, 2 e 6 horas de incubação. Além dessa quantidade, foram utilizadas duas e dez vezes mais proteínas no período de 6 horas. A concentração de células SK-BR-3, 1×10^6 células/mL, foi mantida para todos os períodos e para todas as quantidades de Exo utilizadas. O tratamento com Exo se dava concomitante ao plaqueamento das células. Abaixo, tabela com a descrição do tratamento.

Tabela 5 - Células SK-BR-3 foram tratadas com mExo em diferentes concentrações e tempos

Denominação	Concentração Celular	Tratamento	Período (horas)
Controle	1×10^6 /mL	-	2 e 6
27,5ug /2h	1×10^6 /mL	27,5ug mExo	2
13,75ug/6h	1×10^6 /mL	13,75ug mExo	6
27,5ug /6h	1×10^6 /mL	27,5ug mExo	6
137,5ug/6h	1×10^6 /mL	137,5ug mExo	6

FONTE: Romagnoli (2012)

Todos os grupos experimentais foram tratados com os mesmos exossomos de mDCs. Estes mExo apresentavam marcações para as moléculas HLA-ABC, HLA-DR, CD86 e CD81, como observado na figura 26.

Figura 26 - Presença das moléculas HLA-ABC, HLA-DR, CD86 e CD81 nos mExo.

Os Exo foram acoplados com microesferas paramagnéticas, Dynabeads M-450, e analisados por citometria de fluxo. Histogramas representativo dos marcadores de superfície encontrados em mExo utilizado no experimento de incorporação. Nos histogramas a linha vermelha representa os marcadores específicos de superfície e a linha preta a marcação com o isotipo controle IgG1k ou IgG2a.

FONTE: Romagnoli (2012)

Após os períodos de incubação, as células foram irradiadas, contadas e tiveram a concentração ajustada para marcação com anticorpos monoclonais específicos, para análise em citômetro de fluxo. O painel das moléculas analisadas foi o mesmo utilizado para fenotipagem de Exo, portanto, a marcação foi simples. Para ajuste do canal a ser lido no citômetro, as células não tratadas foram marcadas com anticorpo anti-Her-2/neu.

Como pode ser observada na Figura 27, a marcação mais nítida foi a da molécula HLA-DR no grupo tratado com 137,5 μ g de Exo pelo período de 6 horas (molécula HLA-DR apresentou um MFI de 5,04 no grupo 137,5 μ g/6h contra 2,39 do grupo controle). Outras marcações também foram ligeiramente mais intensas no

grupo 137,5 $\mu\text{g}/6\text{h}$, como CD83 (3,14 x 2,94) e CD11c (3,80 x 3,61). Para as demais concentrações não foram observadas diferenças entre os grupos, em nenhum dos períodos analisados (dados não mostrados).

Figura 27 - Incorporação das moléculas HLA-DR, CD83 e CD11c pelas células SK-BR-3, após tratamento com mExo.

Imunofenotipagem das células SK-BR-3 tratadas com 137,5 μg de mExo por 6 horas. Superior esquerdo, *Dot-plot* baseado em tamanho e granulosidade das células SK-BR-3, mostrando *gate* de análise. Ao lado, histograma demonstrando a marcação para Her-2/neu. Neste histograma a linha vermelha representa marcação específica para Her-2/neu e a linha preta a marcação com o isopito controle IgG1k, ambas no grupo controle. Abaixo, Histogramas mostrando as moléculas de superfície, HLA-DR, CD83 e CD11c expressas nas células SK-BR-3, após tratamento com mExo durante 6 horas. A linha vermelha representa as células tratadas com mExo em relação ao grupo controle não tratado (linha preta).

FONTE: Romagnoli (2012)

Em sequência foi delineado novo experimento, objetivando demonstrar o efeito do tratamento das células com a maior quantidade de mExo e maior tempo de incubação (24 horas) Os exossomos aqui utilizados foram originados de uma cultura diferente dos utilizados no experimento anterior. A imunofenotipagem desses mExo detectou a presença apenas das tetraspaninas CD9 e CD81 (Figura 28).

Figura 28 - Presença das moléculas CD9 e CD81 nos mExo.

Os mExo foram acolplados com microesferas paramagnéticas, Dynabeads M-450, e analisados por citometria de fluxo. Histogramas representativo dos marcadores de superfície encontrados em mExo utilizado no experimento de incorporação (24horas). Nos histogramas a linha vermelha representa os marcadores específicos de superfície e a linha preta a marcação com o isotipo controle IgG1k.

FONTE: Romagnoli (2012)

Como foi detectada a presença de moléculas envolvidas com interação intercelular nos mExo, foi realizado ensaio de incorporação, onde os grupos experimentais foram constituídos de 1×10^6 células SK-BR-3/mL e após período de 24 horas de incubação, as células foram irradiadas, contadas e ajustadas as concentrações para a fenotipagem, por citometria de fluxo. Neste experimento foram observadas alterações na expressão das moléculas CD54 e CD9 (Figura 29). Como demonstrado anteriormente, as células da linhagem SK-BR-3 expressam estas moléculas. Aqui foi constatado que o tratamento das células com mExo fez aumentar a expressão da molécula CD54 (MFI de 13 para 22). Por outro lado, a molécula CD9 que estava presente nos mExo utilizados no experimento, teve sua expressão diminuída nas células tumorais, após o tratamento (MFI 110 para 77). Como esperado, não foi detectada a expressão de moléculas envolvidas na ativação linfocitária nas células tratadas com mExo.

Figura 29 - Alteração na expressão das moléculas CD54 e CD9 nas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com mExo.

As células tumorais SK-BR-3 foram tratadas ou não por 24 horas com exossomos obtidos de mDCs. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos e analisadas por citometria de fluxo. Gráfico esquerdo, *Dot-plot* baseado em tamanho e granulosidade das células da linhagem de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3, mostrando *gate* de análise. Histogramas das moléculas CD54 e CD9 analisadas nas células SK-BR-3. A linha vermelha representa as células tratadas com mExo em relação ao grupo controle não tratado (linha preta).

FONTE: Romagnoli (2012)

Diante dessas variações nos resultados, decidiu-se realizar uma cinética, para estabelecer o melhor período de incubação das nanovesículas com as células tumorais. Entretanto, um fator limitante para este ensaio foi a quantidade de mExo obtida. As nanovesículas obtidas após ultracentrifugação são ressuspensas num volume de 200 μ L, tendo uma média de 3,0 μ g/ μ L. Com este material devem ser feitas a dosagem de proteínas, a fenotipagem e o ensaio de incorporação. Assim, outra quantidade de proteína precisou ser estabelecida para que os ensaios pudessem ser repetidos. Resolveu-se, então, utilizar 62,4 μ g de proteína.

Para este experimento foram utilizados mExo de três doadores diferentes. Cada mExo foi adicionado concomitantemente às células SK-BR-3 e mantidos em três tempos diferentes 3, 8 e 12 horas. A Figura 30 mostra a marcação dos mExo usados neste experimento.

Figura 30 - Intensidade dos marcadores de superfície avaliados nos mExo.

Marcador	mExo		
	1	2	3
HLA-ABC	+	++	++
HLA-DR	-	+++	-
CD80	-	-	-
CD86	++	+	++
CD11c	+	+	++
CD54	+	-	+
CD9	+	+	+
CD81	++	++	++

Exossomos de três culturas diferentes de DCs foram acoplados com micoesferas paramagnéticas por 24 horas. Após este período, os exossomos foram marcados com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície e analisados por citometria de fluxo. Superior: Histogramas respresentativos das diferentes marcações encontradas nos mExo. Da esquerda para direita, os histogramas mostram a ausência de marcação (-), fraca marcação (+), moderada marcação (++) e alta marcação (+++). A linha em preto representa o isotipo controle, enquanto, a linha vermelha representa a molécula analisada. Abaixo, tabela demonstrando as diferentes marcações observadas nos três mExo utilizados.

FONTE: Romagnoli (2012)

Os grupos experimentais, contendo $1,2 \times 10^6$ células SK-BR-3/mL, foram tratados ou não com mExo. Após os períodos de incubação, as células tumorais foram irradiadas, contadas e fenotipadas por citometria de fluxo. De modo geral, as marcações encontradas foram baixas (Figura 31), o que de certo modo era esperado. Dentre os períodos analisados, o de 8 horas mostrou ligeira incorporação da maioria das moléculas envolvidas na ativação linfocitária. O tratamento das células SK-BR-3 com mExo2 levou a maior diferença observada, quando comparado ao seu controle, principalmente para as moléculas HLA-DR e CD86 (Histogramas, Figura 31). É interessante notar, que de modo geral, as maiores detecções observadas para as diferentes moléculas ocorre com 8 horas, decaindo após este período.

Figura 31 - Cinética de incorporação das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 pelas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com diferentes mExo.

Análise fenotípica das células SK-BR-3 por citometria de fluxo, após tratamento com mExo de diferentes culturas de mDCs. Os períodos de análise foram de 3, 8 e 12 horas após incubação. Histogramas à esquerda, demonstram as marcações encontradas no grupo de células tumorais tratadas com mExo2. Neles, a linha vermelha representa as células tratadas com mExo2 em relação ao grupo controle não tratado (linha preta). Gráficos à direita, o eixo vertical representa os valores da Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) das moléculas analisadas, o qual é a relação entre a MFI (da molécula em questão) do grupo tratado com mExo, pela MFI do grupo não tratado. Cada molécula foi devidamente identificada acima no gráfico. Abaixo da figura, consta a identificação de cada grupo experimental com a sua respectiva cor.

FONTE: Romagnoli (2012)

Este fenômeno também pode ser observado com outras moléculas, como CD11c e CD54 (Figura 32).

Figura 32 - Cinética de incorporação das moléculas CD11c, CD54, CD9 e CD81 pelas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com diferentes mExo.

Análise fenotípica das células SK-BR-3 por citometria de fluxo, após tratamento com mExo de diferentes culturas de mDCs. Os períodos de análise foram de 3, 8 e 12 horas de após incubação em três períodos 3, 8 e 12 horas de incubação. O eixo vertical representa os valores da Intensidade Mediana de Fluorescência Relativa (MFI relativa) das moléculas analisadas, o qual é a relação entre a MFI (da molécula em questão) do grupo tratado com mExo, pela MFI do grupo não tratado. Cada molécula foi devidamente identificada acima no gráfico. Abaixo da figura, consta a identificação de cada grupo experimental com a sua respectiva cor.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.3 Confirmação da incorporação de Exo pelas células tumorais por microscopia de fluorescência.

Devido à grande variação na intensidade de marcação das moléculas de superfície dos mExo nas células tumorais, a incorporação dessas nanovesículas à estas células foi avaliada também por microscopia de fluorescência. Exossomos obtidos de mDCs (32,5 µg) foram pré-incubados, por 10 minutos, com lectinas fluorescentes, *Wheat Germ Agglutinin Conjugates* – InvitrogenTM (Alexa Fluor 633). Após incubação, as nanovesículas foram lavadas em PBS através ultracentrifugação por 1 hora e ressuspensas em PBS, para tratamento das células tumorais (2×10^5

células). Após marcação, mExo foram incubados com células SK-BR-3 por um período de 8 horas e as mesmas foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Como demonstrado na figura 33 (B e D), as células tumorais SK-BR-3, após tratamento com mExo, passaram a apresentar fluorescência.

Figura 33 - Incorporação de mExo por células tumorais humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3.

As células SK-BR-3 foram tratadas por 8 horas com exossomos derivados de mDCs, os quais foram previamente marcados com *Wheat Germ Agglutinin Conjugates – InvitrogenTM* (Alexa Fluor 633). Terminado período de incubação, as células foram processadas para análise por microscopia de fluorescência. (A e C) fotos da lâmina controle, marcação com DAPI. (B e D) fotos da lâmina do grupo tratado com mExo fluorescente. Os parâmetros usados para os lasers foram os mesmos para as duas lâminas. Em azul, marcação com DAPI. Em vermelho, mExo corados com lectinas conjugadas com Alexa Fluor 633. Análise em objetiva 63X com óleo de imersão.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.4 Envolvimento da tetraspanina CD9 na incorporação de Exo pelas células tumorais

Inicialmente este experimento foi delineado com a tentativa de otimizar a incorporação dos Exo às células tumorais. Para tal, foi testado se o tratamento prévio de mExo com anti-CD9 purificado, seria capaz de realizar uma ligação cruzada entre as nanovesículas e as células, uma vez que ambas expressam esta molécula. Assim, aproximadamente 1×10^6 células SK-BR-3 foram tratadas com 130µg de Exo, os quais foram ou não pré-incubados com anti-CD9 purificado (10µg/mL). Este tratamento prévio se deu sob agitação horizontal por um período de 40 minutos para formação do complexo Exo/anti-CD9 (grupo mExo + CD9). Após este período o material foi colocado em contato com as células tumorais por um período de 8 horas. Terminado o período de incubação, as células tumorais foram marcadas com anticorpo anti-HLA DR. Como demonstrado na figura 34A, as células tumorais tratadas com mExo, pré incubados ou não com anti-CD9, passaram a expressar as moléculas HLA-DR. O tratamento com o complexo Exo/anti-CD9, resultou numa queda de 35% para 21% nas células HLA-DR⁺, quando comparado com o grupo tratado só com Exo (Figura 34B). Também foi possível observar a queda da MFI dessa molécula após tratamento com o complexo Exo/anti-CD9 (547 para 350).

Figura 34 - Envolvimento da tetraspanina CD9 na incorporação de mExo pelas células tumorais SK-BR-3.

mExo (130 μ g) foram ou não pré-tratados com anti-CD9, por 40 minutos. Após marcação, os mExo foram incubados por 8 horas com as células tumorais SK-BR-3. Terminado o período de incubação, as células foram processadas para análise por microscopia de fluorescência. (A) Gráficos representativos das Intensidades Medianas de Fluorescência (MFI) do marcador HLA-DR. Denominação dos grupos experimentais encontra-se acima dos gráficos. Linha preta, isotipo controle; linha vermelha, marcador específico. (B) À esquerda: gráfico representativo da sobreposição das MFIs da molécula HLA-DR; as barras representam as porcentagens de células positivas, dos grupos não tratado com mExo, tratado com mExo e tratado com complexo mExo/CD9 (de baixo para cima). Linha preta representa grupo não tratado; linha vermelha representa grupo tratado com mExo sem anti-CD9; linha azul representa grupo tratado com mExo, pré incubado com anti-CD9. À direita: quadro demonstrativo dos valores de porcentagem de células HLA-DR+ e da MFI, dos grupos tratados com as nanovesículas, descontados dos valores do grupo não tratado com mExo.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.5 Ensaios para verificar a capacidade aloestimuladora das células tumorais SK-BR-3 tratadas com exossomos de DCs.

4.2.5.1 Ensaios de linfoestimulação

O primeiro ensaio linfoestimulador foi realizado simultaneamente ao ensaio de incorporação das células tumorais tratadas com mExo, demonstradas anteriormente na Figura 27. Assim, as células irradiadas foram também colocadas em co-cultura com linfócitos T alogênicos aos mExo, por período de 5 dias, na proporção 1:10 (estimulador:respondedor). Os sobrenadantes da co-cultura foram testados em ensaio de ELISA para as citocinas IFN- γ e IL-10. Os níveis de IFN- γ encontrados

foram próximos aos encontrados nas culturas de linfócitos sem nenhum estímulo (Figura 35).

Figura 35 - Avaliação da produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISA nas co-culturas.

Dosagem de IFN- γ dos sobrenadantes, após 5 dias de co-culturas. Linfócitos T alogênicos foram co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com diferentes quantidade de mExo, em diferentes tempos. Linha pontilhada vermelha representa o nível de citocina liberada pelos linfócitos T não estimulados. Linha verde pontilhada representa o nível mínimo de detecção do teste. LT, sigla para linfócitos T; pha, sigla para fitoemaglutinina, utilizada como mitógeno. Barras pretas representam as co-culturas de linfócitos T com as células tumorais, tratadas ou não com mExo. Barras cinza representam somente os grupos de células tumorais, tratadas ou não com mExo. Nível de detecção 300 à 4,68 pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

Quanto a análise da produção de IL-10, todos os grupos de linfócitos com células tumorais, tiveram um ligeiro aumento nos níveis de IL-10 em relação aos linfócitos não estimulados, sendo mais proeminente no grupo com células tumorais não tratadas com mExo (Figura 36).

Figura 36 - Avaliação da produção de IL-10 pelo ensaio de ELISA nas co-culturas.

Dosagem de IL-10 dos sobrenadantes, após 5 dias de co-culturas. Linfócitos T alogênicos foram co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com diferentes quantidade de mExo, em diferentes tempos. Linha pontilhada vermelha representa o nível de citocina liberada pelos linfócitos T não estimulados. Linha verde pontilhada representa o nível mínimo de detecção do teste. LT, sigla para linfócitos T; pha, sigla para fitoemaglutinina, utilizada como mitógeno. Barras pretas representam as co-culturas de linfócitos T com as células tumorais, tratadas ou não com mExo. Barras cinza representam somente os grupos de células tumorais, tratadas ou não com mExo. Nível de detecção 500 à 7,8 pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

Um segundo experimento foi realizado com as células SK-BR-3, provenientes do experimento de cinética (Figuras 31 e 32). Assim após tratamento com mExo, as células foram irradiadas e co-cultivadas, por 5 dias, com linfócitos T alogênicos aos mExo. Como demonstrado na figura 37, nenhuma proliferação foi observada, nem no grupo tratado com o mitógeno fitoemaglutinina. Os sobrenadantes das culturas foram testados para detectar a presença de citocinas por ensaio imunoenzimático acoplado às microesferas fluorescentes (BIOPLEX). Também não se notou produção significativa das citocinas testadas, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (p70), IL-13 e IL-17 (dados não mostrados). Foi observado baixo nível de TNF- α nas co-culturas com células tumorais tratadas com mExo 1, nos períodos de 3 e 8 horas. (Tabela 6). Apesar de baixo, os níveis de IL-6 foram maiores nas co-culturas com células tumorais tratadas com mExo 2, nos três períodos analisados.

Figura 37 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com mExo (alogênicos).

Células tumorais SK-BR-3 foram tratadas com diferentes mExo, em três diferentes tempos. Após tratamento estas células foram co-cultivadas com linfócitos T alogênicos, por 5 dias, para testar sua capacidade aloestimuladora. Histogramas da esquerda para direita, linfócitos tratados com o mitógeno fitoemaglutinina (pha), linfócitos e células SK-BR-3 não tratadas com mExo (controle), linfócitos e células SK-BR-3 tratadas com mExo1, linfócitos e células SK-BR-3 tratadas com mExo2 e linfócitos e células SK-BR-3 tratadas com mExo3, respectivamente. Análises feitas com *gate* englobando somente os linfócitos viáveis no *dot plot* de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). A linha preta representa os linfócitos que não receberam estímulos para proliferação, e em vermelho a população específica de cada tratamento. De cima para baixo, incubação prévia à co-cultura, das nanovesículas com as células tumorais, períodos de 3, 8 e 12 horas. Número dentro do histograma representando a porcentagem de células que proliferaram.

FONTE: Romagnoli (2012)

Tabela 6 - Detecção de citocinas do sobrenadante de co-cultura através do ensaio imunoenzimático acoplado a microesferas fluorescentes (BIOPLEX).

Tempo de incubação com mExo	Citocina (pg/mL)		
	Grupos	IL-6	TNF- α
	Controle + 1	92,9	142,7
	Controle + 2	554,9	681,9
	LT	0	4,2
	LT+pha	0	20,6
3h	LT+ SKControle	3,8	2,4
3h	LT+ SK+mExo1	2,5	3,9
3h	LT+ SK+mExo2	5,1	2,9
3h	LT+ SK+mExo3	3,6	3,1
3h	SK Controle	0	2,7
3h	SK+mExo 1	0	3,2
3h	SK+mExo 1	0	2,8
3h	SK+mExo 3	0	3,2
8h	LT+ SKControle	0	2,3
8h	LT+ SK+mExo1	0	3,5
8h	LT+ SK+mExo2	5,5	3,7
8h	LT+ SK+mExo3	1	2,5
8h	SK Controle	0	3,2
8h	SK+mExo 1	0	3,4
8h	SK+mExo 1	0	4,1
8h	SK+mExo 3	0	3,1
12h	LT+ SKControle	3,2	2,6
12h	LT+ SK+mExo1	0,8	2,2
12h	LT+ SK+mExo2	13,1	4,0
12h	LT+ SK+mExo3	0	2,0
12h	SK Controle	0	1,5
12h	SK+mExo 1	0	2,9
12h	SK+mExo 1	0	2,7
12h	SK+mExo 3	0	3,6

Obs. Controles 1 e 2, são amostras positivas que vem junto ao kit.

Nível de detecção para as citocinas, 3,2 – 10.000pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

Estes resultados remeteram à necessidade de aperfeiçoamento da sensibilização dos ensaios para detectar a estimulação linfocitária.

4.2.5.2 Outras estratégias empregadas para tentar avaliar a linfoestimulação por células tumorais tratadas com mExo

4.2.5.2.1 Formação de pool de exossomos

Foi delineado novo experimento, o qual resultaria em maior disponibilidade de material a ser testado. Para tal, vários Exo originados de iDCs ou mDCs foram misturados, formando um pool de iExo e outro pool de mExo, respectivamente. Após

dosagem de proteína, bem como fenotipagem, não foram detectadas grandes diferenças em relação as análises de Exo isolados (dados não mostrados).

Assim, os *pools* de iExo e mExo foram adicionados concomitantemente à células SK-BR-3 por 8 horas. Para poder comparar aos resultados prévios obtidos no experimento de cinética (Figuras 31 e 32), a quantidade de proteína adicionada neste experimento foi de 62,4 µg, para $1,2 \times 10^6$ células SK-BR-3. Após este período as células foram fenotipadas por citometria de fluxo. Não foram observadas incorporações de nenhuma das moléculas envolvidas na ativação linfocitária. As variações observadas foram com as tetraspaninas, CD9 e CD81 (Figura 38). Enquanto, observou-se ligeiro aumento da molécula CD9 no tratamento com *pool* de mExo (MFI de 2276 para 2948), verificou-se a diminuição da molécula CD81, após tratamento das células tumorais com os *pools* (MFI de 6572 para 4740 com iExo e de 6572 para 4609 com mExo).

Figura 38 - Variação da expressão de tetraspaninas nas células tumorais SK-BR-3, após tratamento com *pool* de Exo.

Histogramas mostrando marcação das moléculas CD9 e CD81 nas células SK-BR-3, após 8 horas de incubação com *pools* iExo (linha vermelha) e mExo (linha azul). A linha preta representa o grupo não tratado com *pool* de Exo.

FONTE: Romagnoli (2012)

Além da análise fenotípica, parte das células tratadas foi co-cultivada com linfócitos T alogênicos, entretanto, como esperado, nenhuma linfoestimulação foi observada (Figura 39).

Figura 39 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com *pools* de iExo e mExo (alôgenicos).

Células tumorais SK-BR-3 foram tratadas com *pools* de Exo (8 horas) e então co-cultivadas, por 5 dias, com linfócitos T alôgenicos aos Exo, previamente corados com CFSE. Após este período os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos para CD3, CD4 e CD8 e avaliados por citometria de fluxo. Primeira linha de histogramas referente as análises feitas no *gate* da população de linfócitos T CD4+. Segunda linha referente as análises feitas no *gate* da população de linfócitos T CD8+. A linha preta representa os linfócitos que não receberam estímulos para proliferação, e em vermelho os linfócitos estimulados. Acima na figura, descrição dos estímulos aplicados, mitógeno fiitoemaglutinina (pha), células SK-BR-3 não tratadas, células SK-BR-3 tratadas com *pool* 1 iExo e células SK-BR-3 tratadas com *pool* 1 mExo, respectivamente. Os números acima das barras representam a porcentagem de células que apresentaram diluição de CFSE.

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.5.2.2 Adição de IL-2 a co-cultura

Simultaneamente, ao experimento descrito no item acima, foram feitas algumas modificações no protocolo, primeiro, os linfócitos foram selecionados positivamente para a molécula CD3, segundo, concomitante à constituição da co-cultura foi adicionada a interleucina 2 (IL-2). Como pode ser observado na figura 40, nenhuma proliferação foi evidenciada nos grupos co-cultivados com células tumorais tratadas com *pool* 2 de iExo e mExo.

Figura 40 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com *pools* de iExo e mExo (alogênicos).

Células tumorais SK-BR-3 foram tratadas com *pools* de Exo (8 horas) e então co-cultivadas, por 5 dias, com linfócitos T alogênicos aos Exo, previamente corados com CFSE. Após este período os linfócitos foram marcados com anticorpos específicos para CD3, CD4 e CD8 e avaliados por citometria de fluxo. Primeira e segunda linha de histogramas referente as análises feitas no *gate* da população de linfócitos T CD4+, sem ou com presença de IL-2, respectivamente. Terceira e quarta linha de histogramas referente as análises feitas no *gate* da população de linfócitos T CD8+, sem ou com presença de IL-2, respectivamente. A linha preta representa os linfócitos T que não receberam estímulos para proliferação e em vermelho os linfócitos estimulados. Acima na figura, descrição dos estímulos aplicados, mitógeno fitoemaglutinina (pha), células SK-BR-3 não tratadas, células SK-BR-3 tratadas com *pool* 2 iExo e células SK-BR-3 tratadas com *pool* 2 mExo, respectivamente. Barra dentro dos histogramas mostrando a porcentagem de células que proliferaram (diluíram o CFSE).

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.5.2.3 Adição de TGF- β a co-cultura

Uma vez, que a maioria de tumores malignos expressa TGF- β , o qual atua como imunossupressor (Wojtowicz-Praga; 2003), levantou-se a questão se este não estaria sendo produzido pelas células tumorais SK-BR-3 e assim sobrepujando a qualquer efeito positivo que a incorporação das nanovesículas a estas células poderiam exercer sobre a proliferação de linfócitos, bem como na indução de uma resposta imune antitumoral. Para essa investigação, 1 ng/ml de anticorpos monoclonais anti-TGF- β foram adicionados no dia zero das co-culturas entre as células SK-BR-3 (pré-tratadas ou não com mExo de 3 doadores distintos) e linfócitos T CD3⁺ (previamente isolados por microesferas magnéticas e corados com CFSE). Após 5 dias, foi analisada a diluição de CFSE nos linfócitos tratados ou não com anti-TGF- β , entretanto, não foi constatada proliferação em nenhum dos grupos analisados (dados não mostrados), mesmo no grupo de células tumorais que apresentou incorporação de HLA-DR, onde 69% das células eram HLA-DR⁺ (dados não mostrados).

4.2.5.2.4 Análise da sensibilização de linfócitos

Inicialmente, 5×10^5 mDCs foram pulsadas ou não com 13 ou 26 μ g de exossomos das células tumorais SK-BR-3 (Tex), por 8 ou 24 horas. Para o período de 8 horas, apenas a molécula CD54 sofreu alteração, sendo mais expressa nas mDCs tratadas com 26 μ g de Tex (MFI 18.393), seguida pelas mDCs tratadas com 13 μ g de Tex (MFI 18.780) e mDCs não tratadas (MFI 13.017). As maiores diferenças foram observadas no período de 24 horas de incubação, em que o tratamento com 26 μ g de Tex praticamente dobrou a expressão das moléculas HLA de classe II, HLA-ABC, CD80, CD86 e CD54 em comparação aos demais grupos (Figura 41). Nenhuma das concentrações utilizadas de Tex levou à detecção de Her-2/neu na membrana plasmática das DCs.

Figura 41 - Perfil de expressão das moléculas HLA-DP,DQ,DR, HLA-ABC, CD80, CD86 e CD54 nas mDCs tratadas ou não com exossomos tumorais.

Após obtenção das mDCs, estas foram ou não tratadas com 13 ou 26 µg de Exo originados de células tumorais SK-BR-3 (Tex), por 24 horas e analisadas por citometria de fluxo. Resultados representados através da Intensidade Mediana de Fluorescência relativa, a qual é a relação entre da MFI do marcador das DCs tratadas com Tex, pela MFI do mesmo marcador no grupo não tratado com Tex.

FONTE: Romagnoli (2012)

Uma vez verificado o aumento de moléculas envolvidas na ativação de linfócitos T em DCs pulsadas com Exo de células tumorais, estas DCs foram utilizadas para sensibilizar linfócitos T (autólogos às DCs) por 7 dias. Assim, 5×10^5 mDCs foram pulsadas com 26 µg de Tex, por 24 horas. Após incubação com Tex, as mDCs foram co-cultivadas com células não aderentes autólogas, na proporção 1:10 respectivamente, por um período de 7 dias. Ao terceiro dia, a cultura foi suplementada com IL-2 (12,5 U/mL) e IL-7 (2,5 ng/mL), para manutenção dos possíveis clones estabelecidos. Do terceiro ao sexto dia, cerca de 600 µL da co-cultura foram substituídos por R-10 fresco, devido à acidificação apresentada pelo sobrenadante da cultura. Ao 7º dia, as células foram coletadas e submetidas à separação positivamente por microesferas magnéticas anti-CD3. Os linfócitos T selecionados positivamente foram corados com CFSE e co-cultivados, por 3 e 5 dias, com células tumorais SK-BR-3 (proporção 10 linfócitos : 1 SK-BR-3) tratadas ou não com iExo e mExo. No total foram utilizados 7 iExo e 6 mExo originados de diferentes culturas de DCs imaturas e maduras, respectivamente, constituindo assim um ensaio alogênico (as descrições dos grupos experimentais e as relações entre os Exo utilizados encontram-se nas tabela 7).

Tabela 7 - Descrição dos grupos criados para o ensaio de proliferação alogênica

Denominação	Descrição
LT não estimulados*	Linfócitos TCD3 ⁺
LT + pha	Linfócitos TCD3 ⁺ estimulados com fitoemaglutinina
LT + SKCrI	Linfócitos TCD3 ⁺ estimulados com células tumorais SK-BR-3 não tratadas com Exo
LT + SKiExo (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7)	Linfócitos TCD3 ⁺ estimulados com células tumorais SK-BR-3 tratadas com iExo originários de diferentes culturas de iDC.
LT + SKmExo (1, 2, 4, 5, 6 e 7)	Linfócitos TCD3 ⁺ estimulados com células tumorais SK-BR-3 tratadas com mExo originários de diferentes culturas de mDC.
SKiExo (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7)	Células tumorais SK-BR-3 tratadas com iExo originários de diferentes culturas de iDCs.
SKmExo (1, 2, 4, 5, 6 e 7)	Células tumorais SK-BR-3 tratadas com mExo originários de diferentes culturas de mDCs.

* Todos os linfócitos T utilizados foram pré-sensibilizados com mDCs pulsadas com exossomos de células SK-BR-3.

FONTE: Romagnoli (2012)

A concentração de Exo utilizada seguiu a proporção 130 µg de Exo originados de DCs para cada 1x10⁶ células tumorais, semelhante ao descrito nos experimentos anteriores. No terceiro e no quinto de cultura, o sobrenadante foi coletado para análise das citocinas IFN-γ e IL-10, por ELISA, assim como, as células foram coletadas e marcadas com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 para análise em citômetro de fluxo.

Como demonstrado na figura 42A, foi construído *gate* baseado no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de linfócitos. Dentro deste *gate* foi construído outro, onde as células eram CD3⁺. Assim, as células CD3⁺ foram analisadas pelo índice de estimulação, que é a relação entre a MFI de CFSE do grupo de linfócitos T CD3⁺ não estimulados, pela MFI dos grupos de linfócitos estimulados. Ao 3º dia de co-cultura, não foram verificadas proliferação (estimulação) nos grupos de linfócitos re-estimulados com células tumorais tratadas ou não com Exo (Figura 42B e C).

Figura 42 - Análise da capacidade linfoestimuladora das células tumorais tratadas com iExo e mExo (alogênicos).

Células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não previamente com Exo foram co-cultivadas, por 3 dias, com linfócitos TCD3⁺ pré-sensibilizados para exossomos tumorais por mDCs. (A) Representação dos *gates* de análise; primeiro *gate* baseado em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de linfócitos; dentro deste, foi criado outro *gate*, onde as células eram CD3⁺. Representação de apenas 3 grupos conforme indicado na figura. (B) Índice de estimulação dos linfócitos TCD3⁺ frente as células tumorais tratadas ou não com diferentes iExo (n=7). (C) Índice de estimulação dos linfócitos TCD3⁺ frente as células tumorais tratadas ou não com diferentes mExo (n=6). O índice foi construído baseado na relação das MFIs dos grupos de linfócitos não estimulados, pela MFI dos linfócitos estimulados. Abaixo de cada barra constam os grupos que constituíram cada co-cultura com linfócitos T. O sinal + refere-se à presença do mitógeno ou do grupo de células tumorais; o sinal - refere-se a ausência dos mesmos.

FONTE: Romagnoli (2012)

Como descrito anteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e analisados quanto à presença das citocinas IFN- γ e IL-10. Como demonstrado na

figura 43A e B, não houve diferença de produção de IFN- γ entre os grupos tratados ou não com iExo e mExo, respectivamente. O grupo controle produziu aproximadamente 185 pg/mL de IFN- γ , o grupo com SKCrl cerca de 138 pg/mL e a média dos grupos com linfócitos T com células tumorais tratadas com iExo e mExo foi de 151 e 149 pg/mL, respectivamente (Figura 43A e B). Devido a um erro técnico, não foi possível analisar os sobrenadantes dos grupos de linfócitos T co-cultivados com células SK-BR-3 tratadas com iExo 2 e 3. Quanto a análise dos grupos somente com células tumorais tratadas com iExo e mExo, de modo geral, a produção foi abaixo do nível de detecção da curva (Figura 43C).

Figura 43 - Dosagem de IFN- γ ao 3º dia, pela técnica de ELISA, da co-cultura de linfócitos TCD3⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com Exo.

Células tumorais SK-BR-3 tratadas ou não previamente com Exo, foram co-cultivadas por 3 dias com linfócitos TCD3⁺, pré-sensibilizados para exossomos tumorais por mDCs. (A) Dosagem IFN- γ dos grupos de linfócitos sensibilizados ou não contra antígenos tumorais e co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com iExo. (B) Dosagem de IFN- γ dos grupos de linfócitos sensibilizados ou não contra exossomos tumorais e co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas com mExo. (C) Dosagem de IFN- γ da cultura de células tumorais SK-BR-3 tratadas ou não previamente com i Exo ou mExo, por 8 horas. Linha vermelha representa o nível detectado no grupo de linfócitos não estimulados; linha azul representa o nível detectado no grupo de linfócitos co-cultivados com células SK-BR-3 não tratadas; O sinal +, refere-se à presença do mitógeno ou do grupo de células tumorais; o sinal - refere-se a ausência dos mesmos. Variação da curva padrão 300 a 4,8 pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

Assim como com IFN- γ não foram observadas diferenças nos níveis de IL-10 das co-culturas com células tumorais tratadas com Exo (Figura 44A e B). De modo geral, os níveis foram baixos. Como demonstrado na figura 44C, todas as células tumorais tratadas com Exo tiveram o nível de IL-10 abaixo do menor nível de detecção da curva padrão.

Figura 44 - Dosagem de IL-10 ao 3º dia, pela técnica de ELISA, da co-cultura de linfócitos TCD3⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com Exo.

Células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não previamente com Exo, foram co-cultivadas por 3 dias com linfócitos TCD3⁺, pré-sensibilizados contra exossomos tumorais por mDCs (A) Dosagem IL-10 dos grupos de linfócitos sensibilizados contra antígenos tumorais e co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com iExo. (B) Dosagem de IL-10 dos grupos de linfócitos sensibilizados contra antígenos tumorais e co-cultivados com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com mExo. (C). Dosagem de IL-10 da cultura de células tumorais SK-BR-3 tratadas ou não previamente com mExo, por 8 horas. Linha vermelha representa o nível detectado no grupo de linfócitos não estimulados; linha azul representa o nível detectado no grupo de linfócitos co-cultivados com células SK-BR-3 não tratadas; linha verde representa menor nível de detecção da curva padrão. O sinal + refere-se à presença do mitógeno ou do grupo de células tumorais; o sinal - refere-se a ausência dos mesmos. Variação da curva padrão 500 a 7,8 pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

Da mesma forma, ao 5º dia de co-cultura, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para os mesmos marcadores. Como ocorrido ao 3º dia, em nenhuma das co-culturas de linfócitos T com células tumorais tratadas com Exo foram observadas proliferações, assim como, não foram observadas diferenças na produção de citocinas (dados não mostrados).

Diante desses resultados, outra estratégia foi desenvolvida utilizando-se linfócitos T autólogos aos Exo, a qual será melhor descrita nos itens que se seguem.

4.2.5.3 Ensaios de linfoestimulação autólogos

4.2.5.3.1 Ensaios com linfócitos TCD3⁺ sensibilizados contra exossomos tumorais por DCs

Uma vez que a resposta autóloga se dá pela especificidade de reconhecimento, novo protocolo foi delineado para sensibilização de linfócito T, como demonstrado na figura 45 (descrição detalhada na legenda). Neste protocolo foi utilizado exossomos de células tumorais (Tex) como fonte de antígenos destas. Como os demais ensaios funcionais com células SK-BR-3 tratadas com nanovesículas foram realizados apenas com exossomos obtidos de DCs maduras, a partir desse momento os mExo serão designados como dExo para facilitar futuras denominações.

Figura 45 - Esquema do protocolo de sensibilização de linfócitos TCD3⁺ contra exossomos tumorais (Tex).

No dia zero de cultura, a partir de PBMC, foram obtidas células CD14⁺ (monócitos, Mo), as quais foram cultivadas em presença de IL-4 e GM-CSF por 7 dias, para geração de DCs. Parte dos monócitos foi congelada, para posterior uso na sensibilização de linfócitos T. Também no dia zero, foram coletadas células não aderentes (CNAs), que são em sua grande maioria células de origem linfóide. Após coleta, as CNAs foram congeladas. Ao 5º dia de cultura, as iDCs foram pulsadas ou não com exossomos das células tumorais SK-BR-3, Tex (~26 μ g/1x10⁶ iDCs). Ao 6º dia, as iDCs foram estimuladas com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂), por 24 horas. Após este período, o sobrenadante das duas culturas de mDCs (Controle ou Tex) foram submetidos a ultracentrifugações para obtenção dos exossomos (dExo Crl e dExo Tex), os quais foram devidamente identificados e estocados à -80°C. As mDCs foram irradiadas (12,5 Gy) e co-cultivadas com CNAs autólogas. Estas culturas tiveram duração de 7 dias, estando em presença de IL-2 e IL-7. Após este período, as CNAs de cada grupo experimental, identificadas como CNAs Crl e CNAs Tex, foram coletadas e co-cultivadas com monócitos autólogos, previamente pulsados ou não com Tex, por 12 horas (Mo Crl e Mo Tex). Decorrido este período, os monócitos foram irradiados (12,5Gy) e co-cultivados com linfócitos T durante 7 dias, estando também em presença de IL-2 e IL-7. Após estes dias, as CNAs sensibilizadas, foram selecionadas negativamente para a molécula CD3⁺. Este protocolo teve duração total de 21 dias, conforme indicado na seta de tempo, acima na figura.

Denominações: Mo ou CD14⁺ = monócitos; Crl= grupo controle, o qual não foi pulsado com antígeno, apenas tratado com o diluente, PBS; Tex = grupo pulsado ou sensibilizado com exossomos das células SK-BR-3.

FONTE: Romagnoli (2012)

Para este protocolo, foi realizada modificação no método de obtenção de monócitos. Assim, após obtenção das PBMCs por gradiente de densidade, as DCs foram obtidas a partir de células CD14⁺ (monócitos) selecionadas. Esta modificação resulta numa cultura com menos "contaminantes" celulares de origem linfóide. Além

disso, este procedimento leva a uma obtenção de nanovesículas oriundas em sua maioria de DCs.

Como as DCs aqui geradas foram diferentes das utilizadas nos experimentos de linfoestimulação alogênicos, nova análise fenotípica foi realizada, a qual consta em anexo (Anexo A e B).

Após isolamento os linfócitos TCD3⁺ sensibilizados contra antígenos tumorais (como esquematizado na figura 45) foram co-cultivados, por 4 horas e em diferentes proporções (16:1, 8:1 e 4:1), com células tumorais, tratadas ou não com os dExo Crl e dExo Tex, para testar o potencial citotóxico destes linfócitos frente ao alvo. Foram realizados dois experimentos, mas em nenhum deles foi possível verificar um padrão de resposta citotóxica (dados não mostrados).

Simultaneamente, foi delineado outro protocolo experimental (Figura 46), para uma análise mais ampla do possível potencial estimulador das células tumorais, tratadas com dExo. A partir deste delineamento, vários parâmetros foram avaliados, tais como, análise da expressão do marcador de ativação linfocitário CD69, dosagem de citocinas do sobrenadante das co-culturas, número de linfócitos T produtores de IFN- γ , bem como expressão de SOCS3 nos mesmos.

Figura 46 - Esquema do ensaio de lifoestimulação autólogo por células tumorais, tratadas ou não com dExo Tex.

As células tumorais SK-BR-3 foram previamente tratadas ou não com dExo (Crl ou Tex), por 8 horas ($130\mu\text{g}/10^6$ células). Após este período, estas células foram co-cultivadas, por 2 dias, com os linfócitos T CD3⁺ sensibilizados (1:10) ou não contra antígenos tumorais. Apesar de não esquematizado na figura, os grupos de linfócitos pré-sensibilizados foram tratados ou não com fitoemaglutinina ou concanavalina A (ConA), como controles positivos. Este esquema foi utilizado para co-culturas, onde decorridos 2 dias, os linfócitos foram marcados com anticorpo específico para CD69 e os sobrenadantes foram analisados para detecção da produção de citocinas por CBA (n=2), ambos por citometria de fluxo. Além disso, este esquema também foi utilizado para o ensaio de Elispot, com o intuito de quantificar o número de linfócitos produtores de IFN- γ (n=5). Também foi realizada a análise da expressão de SOCS3 nos linfócitos da co-cultura (n=1).

FONTE: Romagnoli (2012)

Assim, após 2 dias, os linfócitos das diferentes co-culturas foram marcados com anti-CD69, para verificar se estes estavam ativados. No entanto, não foram constatadas diferenças entre os diferentes grupos (dados não mostrados). De modo geral a frequência encontrada foi baixa ficando entre 1 e 2% de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺/CD69⁺ e linfócitos TCD3⁺/CD8⁺/CD69⁺. Também não foram observadas diferenças, quanto a MFI da molécula CD69 nos diferentes grupos.

Os sobrenadantes das co-culturas foram recolhidos e analisados para a detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A por CBA. Como demonstrado na figura 47, os níveis detectados foram muito baixos, mas possíveis de serem quantificados para IL-6, nos grupos de linfócitos T CD3⁺ sensibilizados contra antígenos tumorais e co-cultivados com células tumorais, independente da presença de dExo.

Figura 47 - Detecção de IL-6 no sobrenadante das co-culturas de linfócitos T CD3⁺, sensibilizados para Tex, com células tumorais SK-BR-3.

Células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não previamente com dExo (130 $\mu\text{g}/10^6$ células), foram co-cultivadas por 2 dias com linfócitos TCD3⁺, pré-sensibilizados contra exossomos tumorais. (A) Após este período, os sobrenadantes das co-culturas foram recolhidos e foi realizada dosagem de IL-6 por CBA, através de citometria de fluxo. No Gráfico, as barras brancas representam a dosagem apenas nas células tumorais, tratadas ou não com dExo; as barras cinza representam a dosagem nas co-culturas de linfócitos T CD3⁺ do grupo controle com células tumorais, tratadas ou não com dExo; as barras pretas representam a dosagem nas co-culturas de linfócitos T CD3⁺, sensibilizados contra Tex, com células tumorais, tratadas ou não com dExo. O sinal + refere-se à presença do mitógeno ou do grupo de células tumorais; o sinal - refere-se à ausência dos mesmos (n=2); A linha verde pontilhada refere-se ao limite de detecção de IL-6 (limite de 2,4 pg/mL).

FONTE: Romagnoli (2012)

Utilizando-se um método mais sensível para inferir a produção de IFN- γ , resolveu-se quantificar o número de células produtoras desta citocina pela técnica de Elispot. Assim, após 2 dias de co-cultura, as células foram retiradas para dar sequência ao ensaio. Como pode ser verificado na figura 48, de modo geral, todos os linfócitos sensibilizados contra antígenos tumorais por DCs, apresentaram maior número de células produtoras de IFN- γ , que o grupo controle. Além disso, estes

linfócitos (sensibilizados contra antígenos tumorais) apresentaram tendência de maior produção da citocina, quando em presença de células tumorais, diferença esta que foi significativa entre os linfócitos co-cultivados com células tumorais tratadas com dExo Tex e os linfócitos não estimulados. Nas culturas somente com células tumorais não foi detectada produção da citocina (dados não mostrados).

Figura 48 - Aumento do número de linfócitos T produtores de IFN- γ ⁺ sensibilizados contra antígenos tumorais, após co-cultura com células tumorais SK-BR-3.

Células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não previamente com dExo (130 μ g/10⁶ células), foram co-cultivadas por 2 dias com linfócitos TCD3⁺, pré-sensibilizados contra exossomos tumorais por mDCs. Após este período, as células foram eliminadas e foi quantificado por Elispot o número de células produtoras de IFN- γ . No Gráfico, as barras representam as médias com o erro padrão; as barras cinza representam a quantificação nas co-culturas de linfócitos T CD3⁺ do grupo controle com células tumorais, tratadas ou não com dExo; as barras pretas representam a quantificação nas co-culturas de linfócitos T CD3⁺, sensibilizados contra Tex, com células tumorais, tratadas ou não com dExo. O sinal + refere-se à presença de células tumorais; o sinal - refere-se à ausência das mesmas (n=5; ANOVA *p<0,05).

FONTE: Romagnoli (2012)

Também foi avaliada a expressão de SOCS3 nos linfócitos, após co-cultura com células tumorais. Como pode ser observada na figura 49, é nítida a maior expressão de SOCS3 nas co-culturas com células tumorais tratadas com dExo Tex, sendo maior a expressão nos linfócitos do grupo controle, que no grupo sensibilizado contra antígenos tumorais.

Figura 49 - Maior expressão relativa do mRNA de SOCS3 em linfócitos co-cultivados com células tumorais tratadas com dExo Tex.

Células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não previamente com dExo (130 $\mu\text{g}/10^6$ células), foram co-cultivadas por 2 dias com linfócitos TCD3⁺, pré-sensibilizados contra exossomos tumorais por mDCs e monócitos. Após este período os linfócitos foram coletados e analisados quanto a expressão relativa de mRNA de SOCS3. Histogramas mostrando a expressão relativa do mRNA de apenas um experimento. As barras cinza representam expressão em linfócitos T CD3⁺ do grupo controle; as barras pretas representam a expressão em linfócitos T CD3⁺, sensibilizados para Tex. O sinal + refere-se à presença de células tumorais; o sinal - refere-se à ausência das mesmas (n=1).

FONTE: Romagnoli (2012)

4.2.5.3.2 Ensaio com linfócitos TCD3⁺ sensibilizados contra a proteína quimérica Her-2/neu-Fc por DCs

Buscando um maior refinamento no protocolo de sensibilização, algumas modificações foram realizadas. Após obtenção das PBMCs por gradiente de densidade, as DCs foram obtidas a partir de células selecionadas negativamente para a molécula CD14⁺. Também foram utilizados, desde o início da sensibilização, linfócitos TCD3⁺, ao invés de células não aderentes. O modo de obtenção dos dExo foi alterado, aqui eles foram isolados a partir de ultracentrifugação em solução de sacarose (30%) com óxido de deutério (D₂O 99%) em densidade 1.194 g/cm³ e seguido de filtração em tubos com filtro de 100 KDa (Millipore - Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units).

Nestes experimentos, mais um grupo controle foi delineado, onde as DCs foram pulsadas com um antígeno não tumoral e sim com albumina sérica bovina (BSA) (Figura 50).

Figura 50 - Esquema do protocolo de sensibilização de linfócitos TCD3⁺ contra BSA e proteína quimérica Her-2/neu.

No dia zero de cultura, células CD14⁺ (monócitos, Mo) foram cultivadas em presença de IL-4 e GM-CSF por 7 dias, para geração de DCs. Parte dos monócitos foi congelada, para posterior uso na sensibilização de linfócitos T. Também no dia zero, foram selecionados linfócitos TCD3⁺ e submetidos a congelamento. Ao 5º dia de cultura, as iDCs foram pulsadas ou não com BSA (10 μ g/mL) ou proteína quimérica Her-2/neu-Fc (1 μ g/mL). Ao 6º dia, as iDCs foram sensibilizadas com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂), por 24 horas. Após este período, o sobrenadante das três diferentes culturas de mDCs foram submetidos a ultracentrifugações para obtenção dos exossomos (dExo Crl, dExo BSA e dExo Her-2), os quais foram devidamente identificados e estocados à -80° C. As mDCs foram irradiadas (12,5Gy) e co-cultivadas com os linfócitos TCD3⁺ autólogos, selecionados no dia zero da cultura. Estas culturas tiveram duração de 7 dias, estando em presença de IL-2 e IL-7. Após este período os linfócitos de cada grupo experimental, identificados como CD3⁺ Crl, CD3⁺ BSA, CD3⁺ Her-2, foram coletados e co-cultivados com monócitos autólogos, previamente pulsados ou não com BSA ou com a proteína Her-2/neu-Fc, por 12 horas. Decorrido este período, os monócitos foram irradiados (12,5Gy) e co-cultivados com linfócitos T durante 7 dias, estando também em presença de IL-2 e IL-7. Após estes dias, os linfócitos TCD3⁺ sensibilizados, foram novamente selecionados. Este protocolo teve duração total de 21 dias, conforme indicado na seta de tempo, acima na figura. **Denominações:** Mo ou CD14⁺ = monócitos; Crl= grupo controle, o qual não foi pulsado com antígenos; BSA = grupo pulsado ou sensibilizado com Albumina Sérica Bovina, Her-2 = grupo pulsado ou sensibilizado com a proteína quimérica Her-2/neu-Fc.

FONTE: Romagnoli (2012)

Assim, após isolamento dos linfócitos TCD3⁺ sensibilizados, estes foram co-cultivados por 4 horas com células tumorais, tratadas ou não com os diferentes dExo, para testar o potencial citotóxico destes linfócitos frente ao alvo, conforme esquematizado na figura 51. A análise do ensaio de citotoxicidade mostrou que os linfócitos sensibilizados para BSA foram capazes de lisar maior número de células tumorais tratadas com dExo Crl e dExo BSA, que o grupo não tratado, sendo a maior porcentagem de lise na proporção 16:1 (figura 52B e C). Os demais grupos de linfócitos não tiveram um padrão de resposta frente às células alvo, independente se tratadas ou não com dExo (dados não mostrados).

Figura 51 - Esquema do ensaio de citotoxicidade autólogo.

As células tumorais SK-BR-3 foram previamente coradas com CFSE e tratadas ou não com dExo (Crl, BSA ou Her-2), por 8 horas ($130 \mu\text{g}/10^6$ células). Após este período, estas células foram co-cultivadas ou não com os linfócitos T sensibilizados ou não contra BSA ou contra a proteína quimérica Her-2/neu. Apesar de não esquematizado na figura, os grupos somente com células tumorais tratadas ou não com dExo representaram o grupo “lise espontânea”. Decorridos 4 horas, as células foram coradas com PI e porcentagem de lise foi analisada por citometria de fluxo.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 52 - Células tumorais SK-BR-3 tratadas com dExo são alvos de linfócitos T CD3⁺ sensibilizados contra BSA.

Inicialmente, as células tumorais foram coradas com CFSE e então tratadas ou não dExo Crl ou dExo BSA, por 8 horas ($130 \mu\text{g}/10^6$ células). Após este período, estas células tumorais foram co-cultivadas com linfócitos T sensibilizados contra BSA (conforme figura 50), por 4 horas. Decorridos este tempo, as células foram coradas com PI e a porcentagem de lise foi analisada por citometria de fluxo. Eixo vertical refere-se a porcentagem de lise, onde as células são duplo positivas (CFSE⁺/PI⁺). (A) Co-cultura de linfócitos TCD3⁺ BSA com células SK-BR-3 não tratadas com dExo. (B) Co-cultura de linfócitos TCD3⁺ BSA com células SK-BR-3 tratadas com dExo Crl. (C) Co-cultura de linfócitos TCD3⁺ BSA com células SK-BR-3 tratadas com dExo BSA. Todas as co-culturas foram feitas nas proporções 16:1, 8:1 e 4:1 (linfócitos : células tumorais). Lise esp., abreviação de lise espontânea das células tumorais não co-cultivadas com linfócitos (controle negativo).

FONTE: Romagnoli (2012)

Este experimento foi repetido, no entanto, não foi observado o mesmo padrão de resposta. Simultaneamente aos ensaios de citotoxicidades, os linfócitos TCD3⁺ sensibilizados foram co-cultivados por 5 dias com células tumorais, tratadas ou não com os diferentes dExo, para análise de proliferação e dosagem de citocinas no sobrenadante, por CBA, conforme esquematizado na figura 53.

A análise da produção de citocinas para os dois experimentos mostrou que após 5 dias de co-cultura (120 horas), há uma acentuada produção de IL-6 em todas as co-culturas, independente se as células tumorais foram tratadas ou não com os

diferentes dExo (Figura 54). Para as demais citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL17-A, não foram detectados níveis de produção. Também não foi verificado linfoestimulação após 5 dias de co-cultura (dados não mostrados).

Figura 53 - Esquema do ensaio de linfoestimulação autólogo.

As células tumorais SK-BR-3 foram previamente tratadas ou não com dExo (Crl, BSA ou Her-2), por 8 horas ($130 \mu\text{g}/10^6$ células). Após este período, estas células foram irradiadas (40 Gy) e co-cultivadas com os linfócitos T sensibilizados (1:10) contra BSA ou contra a proteína quimérica Her-2/neu. Antes, da adição dos linfócitos, estes foram corados com CFSE, para posterior análise de proliferação. Apesar de não esquematizado na figura, todos os três grupos de linfócitos pré-sensibilizados foram tratados ou não com fitoemaglutinina (pha), constituindo estes os controles positivo e negativo, respectivamente. Decorridos os 5 dias de cultura, os sobrenadantes das co-culturas foram coletados e analisados para dosagem de diferentes citocinas por CBA.

FONTE: Romagnoli (2012)

Figura 54 - Dosagem por CBA da produção de IL-6 das co-culturas de linfócitos TCD3⁺ com células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com dExo.

As células tumorais SK-BR-3 foram tratadas ou não previamente com dExo (Crl, BSA, Her-2), por 8 horas ($130\mu\text{g}/10^6$ células). Após este período, estas células foram irradiadas (40Gy) e co-cultivadas com os linfócitos T sensibilizados (1:10) contra BSA ou contra a proteína quimérica Her-2/neu. Decorridos os 5 dias de cultura, o sobrenadante foi coletado e a dosagem de citocina foi feita por CBA, através de citometria de fluxo. As barras brancas representam os sobrenadantes das células tumorais; as barras cinza claras representam os sobrenadantes das culturas com linfócitos T CD3⁺Crl; as barras cinza escuras representam os sobrenadantes das culturas com linfócitos T CD3⁺BSA; as barras pretas representam os sobrenadantes das culturas com linfócitos T CD3⁺BSA; pha, abreviação para o mitógeno fitoemaglutinina. O sinal + significa a presença do mitógeno ou das células tumorais e o sinal – a ausência dos mesmos. Nível de detecção de IL-6 é 2,4 pg/mL.

FONTE: Romagnoli (2012)

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou o potencial de modificação de células tumorais pela incorporação nestas de exossomos liberados por DCs. Foram investigadas também as consequências dessa incorporação, sobre a interação das células tumorais com as células do sistema imune, especificamente os linfócitos T, avaliando, *in vitro*, o potencial imunogênico das células tumorais tratadas com os Exo.

Nossos resultados mostraram que após tratamento com exossomos de DCs, as células tumorais apresentaram alterações em seu fenótipo, com incorporação de moléculas envolvidas na ativação linfocitária e/ou variação na expressão de moléculas de adesão celular já existente. Nas condições estudadas, as alterações fenotípicas obtidas não foram suficientes para conferir, *in vitro*, imunogenicidade indiscutível às células tumorais.

Inicialmente, neste trabalho, procurou-se estabelecer o fenótipo das células das quais seriam obtidos os Exo, as DCs derivadas de monócitos *in vitro*. Monócitos de doadores saudáveis, separados em gradiente de densidade, foram cultivados em condições padronizadas em nosso laboratório (diferenciação induzida por GM-CSF e IL-4 e ativação com TNF- α). A diferenciação foi avaliada pela morfologia e pelo perfil fenotípico das células antes e depois da cultura, estudando-se vários marcadores de superfície, os quais também indicam o estado de maturação destas células.

Nossos resultados mostraram queda na frequência de células CD14⁺, bem como diminuição de sua intensidade na superfície celular ao longo da cultura (Figura 6). Também foi detectado aumento tanto da frequência, quanto da intensidade de expressão das moléculas CD80 e CD86 (Figuras 8 e 9). A diferença esperada entre iDCs e mDCs para estes marcadores, nem sempre foi muito clara. Talvez, ela ficasse mais evidente com o aumento do número de amostras. Esta observação é condizente com a heterogeneidade que há na raça humana, para o qual ainda contribui o dimorfismo sexual apresentado pelo sistema imune (Hughes e Clark, 2007), uma vez que nossos doadores de sangue foram tanto homens, quanto mulheres. Sabe-se que as mulheres possuem mais resistência às infecções que homens e que isto se deva, provavelmente à superioridade das respostas imunes humoral e celular encontradas nas mulheres, as quais parecem estar diretamente relacionadas com os hormônios sexuais (Ansar Ahmed et al., 1985). De fato, já foi demonstrado que as DCs apresentam receptores para estrógeno e progesterona, o que explica a influência desses hormônios na indução de diferenciação de DCs a

partir de monócitos, *in vitro* (Hughes e Clark, 2007). Além disso, nesta revisão, os autores ressaltam que a progesterona e o estrógeno regulam a ativação das DCs por aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD80 e CD86, bem como de MHC-II.

Após aderência dos monócitos, foi realizada lavagem para remoção das células não aderentes, entretanto, como podem ser observados nos gráficos (*Dot plot*) das culturas de DCs deste trabalho, havia a presença de “contaminantes” de outros tipos celulares, predominantemente linfócitos. Estas células restantes podem ter sua frequência alterada de cultura para cultura, uma vez que sua retirada se dá de forma manual. Sabe-se que linfócitos podem gerar uma série de citocinas as quais podem influenciar o microambiente. De fato, quando se consideram DCs geradas a partir de monócitos, vários fatores presentes no microambiente durante a diferenciação, como TNF- α , IL-3, IL-6, IFNs, entre outros, podem determinar a heterogeneidade das DCs geradas *in vitro*, influenciando a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas (Chomarat, et al., 2003; Chomarat et al., 2000; Pulendran et al., 2000).

Quanto às análises da molécula CD83 (Figura 10), observou-se que monócitos já expressavam alta frequência de células CD83⁺, a qual decaiu ao longo do processo de diferenciação/maturação de maneira contrastante com o descrito, em geral, na literatura (Zhou e Tedder, 1995). Este resultado pode ser decorrente do modo ao qual o sangue é colhido do doador, pois temos observado em estudos desenvolvidos em nosso laboratório, que a diferença de metodologia de coleta interfere na expressão deste marcador. Ainda hoje não foi totalmente elucidado o mecanismo de ação da molécula CD83, no entanto, é descrito que ela encontra-se aumentada nas DCs maduras (Zhou e Tedder, 1995) e parece estar diretamente envolvida na ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Baleeiro e Barbuto, 2008; Hirano *et al.* 2006; Kruse *et al.* 2000; Prechtel et al. 2006). Ao que parece, as citocinas ou fatores ativadores utilizados ao longo da diferenciação/ativação de monócitos em DCs, podem modificar o perfil de expressão desta molécula. Quando APCs semelhantes à DCs (CD14⁺/CD83⁺) são ativadas com IFN- α , observou-se um significativo aumento das células HLA-DR⁺/CD83⁺, ao passo que, a adição de LPS a este sistema, resultou em queda da frequência desta população (Gerlini, et al., 2008).

Na análise da molécula CD40, outro marcador de ativação frequentemente usado, ficou evidente a baixa frequência de mDCs positivas, bem como a baixa intensidade desse marcador na membrana (Figura 11). É possível que isto se deva ao uso do TNF- α como ativador de DCs, uma vez que, a maior parte dos estudos que mostram aumento de CD40 usa lipopolissacarídeo (LPS), como fator estimulador destas células (Neves AR, 2008; Hu et al., 2009). Reforçando esta hipótese, a ativação de DCs com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂), levou a um aumento na frequência de mDCs CD40⁺ (Anexo B).

É intrigante a ação que as citocinas ou o LPS podem ter na ativação das DCs e as consequências dessa ação parecem estar diretamente relacionadas com as vias de sinalização que elas possam desencadear. Quando DCs são ativadas com LPS, há um grande aumento da expressão de CD83 e CD40, a qual foi associada ao aumento da proteína reguladora SOCS2 (*Suppressors of Cytokines Signaling*), uma vez que, o silenciamento desta molécula, levou a grande queda de CD83 e moderada de CD40 nas DCs (Hu et al., 2009). Assim, se uma citocina ativa mais uma via de sinalização do que a outra, os perfis de expressão de moléculas de superfície encontrados podem ser diferentes.

Nossos resultados, portanto, demonstraram que as DCs geradas *in vitro* são bastante heterogêneas e essas diferenças podem ter implicações nos demais resultados por nós encontrados.

Uma vez padronizado o método de obtenção das DCs, foram obtidos os Exo delas originados. Após isolamento destes por ultracentrifugação, foi realizada quantificação de proteínas, a qual demonstrou que iDCs liberam níveis ligeiramente superiores de Exo em relação às mDCs, entretanto, essa diferença não foi significativa (Figura 17). Na literatura há relato de que iDCs murinas liberam mais exossomos que mDCs (Segura et al., 2005), o que é compatível com nossa observação.

Exossomos são nanovesículas menores que 100nm (Mathivanan et al., 2009), as quais podem ser caracterizadas por microscopia eletrônica, associada à fenotipagem dos marcadores de membrana. Nossos resultados de microscopia eletrônica de transmissão mostram, de fato, a presença de vesículas de 30 a 200nm, com bicamada lipídica e de morfologia semelhante à de vesículas de origem endossômica em nossos preparados (Figura 22).

Complementando esses dados, a análise por citometria de fluxo confirma a presença nestes preparados de moléculas tipicamente descritas em exossomos obtidos de DCs como HLA-ABC, HLA-DR, CD86, CD11c, CD54, CD18, CD9 e CD81 (Clayton et al., 2001; Segura et al., 2005; Théry et al., 2002; Théry et al., 2001; Viaud et al., 2011; Zitvogel et al., 1998). As demais moléculas pesquisadas (CD1a, CD80, CD83, CD40 e CD123) não foram detectadas.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta observação. A primeira seria que a distribuição das moléculas pesquisadas nas nanovesículas seja um fator comprometedor na detecção. Como os Exo de DCs expressam tipicamente HLA-DR, esta molécula foi utilizada com âncora no acoplamento das nanovesículas às microesferas (conjugadas com anti-MHC-II), para posterior fenotipagem por citometria de fluxo. Assim, caso alguma molécula de superfície nos Exo se encontre próxima à molécula do MHC de classe II, poderia ocorrer uma interferência espacial com a ligação do anticorpo monoclonal à molécula alvo.

Uma outra explicação para esta heterogeneidade de expressão das moléculas de superfície dos Exo pode ser bioquímica. Há um conjunto de proteínas intracelulares que parece estar diretamente relacionado com a inclusão de moléculas para dentro dos corpos multivesiculares (MVBs), dos quais se formam os exossomos. (Buschow et al., 2005; Lakkaraju et al., 2008; Van Niel et al., 2006; Wollert et al., 2010). Algumas dessas proteínas formam um complexo denominado ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*), que reconhecem proteínas monoubiquitinadas e as sequestram para os corpos multivesiculares (Wollert et al., 2010). Sendo assim, é possível que o direcionamento de algumas moléculas seja preterido em relação a outras devido à sua ubiquitinação.

Surpreendentemente, a molécula HLA-DR só foi detectada em 2 preparados de mExo. Este resultado não era esperado, uma vez que esta molécula é descrita como marcante para Exo originados de DCs (Segura et al., 2005). Além do mais, a detecção de todos os outros marcadores analisados dependia da expressão de HLA-DR na superfície dos Exo, uma vez que o acoplamento às microesferas, necessária para a análise no citômetro, acontecia através da ligação com estas microesferas complexadas com anti-MHC classe II. Apenas para a detecção da expressão do próprio MHC-II é que foram usadas microesferas complexadas com anti-MHC-I. Verificamos também que para um mesmo preparado de Exo houve maior intensidade dos demais marcadores no acoplamento com microesferas

complexadas com anti-MHC-II, em comparação à intensidade das mesmas moléculas observada no acoplamento com microesferas complexadas com anti-MHC-I (dados não mostrados).

Outro fato que pode explicar a detecção de HLA-DR em apenas dois preparados é a “contaminação” dos preparados por outros tipos celulares. Embora, a princípio, apenas Exo de DCs expressam MHC-II, a presença de MHC-I é muito mais comum. Assim, Exo provenientes de qualquer tipo celular poderiam ser capturados pelas microesferas via MHC-I, “diluindo”, portanto, o nível de MHC-II, presentes nos Exo oriundos de DCs. E dando suporte a esta hipótese, verificamos que nas duas amostras em que foi caracterizada a presença de HLA-DR, a intensidade deste marcador nas células de origem foi extremamente alta, o que contribuiu para a detecção desta molécula nos Exo.

Diante desses resultados, antes de iniciarmos o tratamento de células tumorais com Exo, decidimos testar a capacidade dos mExo de modificar o fenótipo das DCs. Ficou evidente que o tratamento com mExo, foi capaz de induzir em monócitos fenótipo similar ao observado em células dendríticas maduras, ativadas com TNF- α . O tratamento com mExo, levou na verdade a uma maior expressão das moléculas HLA-DR, CD80, CD86, que no grupo ativado diretamente com TNF- α (Tabela 4). Estes dados mostraram que ao menos DCs são capazes de capturar Exo (originados de outras DCs) e, após esse evento, passam a expressar as moléculas presentes nas nanovesículas, o que está de acordo com a literatura (André et al., 2004).

Assim, verificada a capacidade de alteração fenotípica pelo tratamento com Exo sobre células do sistema imune, decidimos então, testar a capacidade dos Exo de interferirem na superfície das células tumorais. Para esta análise, decidimos utilizar a linhagem humana de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3. Estas células não são estrógeno-dependentes e superexpressam o produto do gene que codifica o receptor de fator de crescimento de epiderme 2 (HER-2/neu ou c-erb-2). A super expressão deste gene confere maior agressividade as células tumorais no câncer de mama e resistência a hormonioterapia (Albert et al., 1998). Na verdade, a relevância desta molécula na biologia do câncer de mama pode ser ainda notada pelo seu papel com alvo em diferentes abordagens terapêuticas (Stojadinovic et al., 2007; Zhou et al., 2002).

As células tumorais SK-BR-3 foram fenotipadas, e ficou evidenciada a ausência de moléculas envolvidas diretamente na ativação linfocitária, como moléculas clássicas do complexo MHC e co-estimuladoras (Figura 23). A ausência destas moléculas é extremamente importante para a detecção funcional da incorporação das nanovesículas. Por outro lado, a presença de moléculas de fusão/adesão, como CD9, CD81 e CD54, nas células tumorais apareceu como um fator positivo, considerando o possível papel destas moléculas na incorporação dos Exo às células.

Além do mais, a presença de CD81 e CD54 nas SK-BR-3, poderia também ser aumentada caso houvesse incorporação dos mExo, favorecendo assim, a interação das células tumorais aos linfócitos T. De fato, CD81 ligando-se às moléculas CD4 e CD8 dos linfócitos T, parece estar envolvido na sinapse imunológica (Maecker et al., 1997). Além disso, a molécula CD54 dos Exo pode interagir com LFA-1 dos linfócitos T, também auxiliando na adesão de membranas (Nolte-t' Hoen et al., 2009).

Assim, de posse dessas informações, diversos experimentos foram realizados para encontrar a concentração “ótima” de Exo a ser utilizada, bem como o período de incubação para a indução de modificações na superfície das células tumorais. O tratamento foi baseado na relação quantidade de Exo/concentração celular, tendo como referência o trabalho de Wolfers et al., 2001. A concentração celular escolhida para os ensaios foi a de 1×10^6 /mL, pois com essa quantidade eram possíveis a realização da fenotipagem das células tumorais e as co-culturas destas com linfócitos T. Também foram testados diferentes tempos de tratamento (2, 3, 6, 8, 12 e 24 horas). Para se chegar à conclusão das melhores condições de incubação, levou-se principalmente em conta a quantidade de Exo obtida, pois deste material foram feitas a quantificação de proteínas, caracterização fenotípica e tratamento das células tumorais.

De modo geral, as relações de 64 e 130 μ g de mExo por 10^6 células tumorais foram as que melhor demonstraram modificações nas células tumorais, nas quais foram possíveis de detectar HLA-DR, CD80 e CD86 (Figuras 27 e 31). A expressão mais intensa foi encontrada no período de 8 horas de incubação com 130 μ g de mExo, em que 35% das células tumorais passaram a expressar a molécula HLA-DR (Figura 34). Estes resultados de transferência de moléculas dos Exo de células do

sistema imune para as células tumorais concordam com dados da literatura que indicam ocorrer tráfego de membranas entre diferentes tipos celulares via exossomos (Davis DM, 2007; Hao et al., 2006b; Mathivanan et al., 2010). Este tráfego de membranas (dos Exo para membrana plasmática) pode ser inclusive um dos mecanismos para a expressão de moléculas de MHC-II em linfócitos T ativados. Nolte-t Hoen et al. (2009) demonstraram que durante a co-cultura de DCs com linfócitos T, estes últimos incorporam exossomos liberados de DCs. A análise desta incorporação, por microscopia eletrônica, demonstrou que os linfócitos passaram a expressar moléculas de MHC-II em sua membrana plasmática, as quais vieram dos Exo de DCs. Esta transferência só foi possível pela ligação de alta afinidade entre as moléculas ICAM-I dos Exo com LFA-I dos linfócitos.

Além das moléculas envolvidas na ativação de linfócitos, a integrina CD11c também foi detectada nas células tumorais, após tratamento com mExo (Figuras 27, 32 e Anexo C). O CD54 (ICAM-I), já expresso nas células SK-BR-3, em alguns experimentos, teve sua expressão aumentada, após 8 horas de incubação com mExo (Figuras 30 e 33). A tetraspanina CD9, por outro lado, que é expressa pelas células tumorais, apresentou queda de expressão após tratamento com mExo (Figura 29 e Anexo C). Esta queda pode, talvez, apontar para o papel desta na fusão entre as duas membranas (das células e do exossomos). De fato, o tratamento prévio de mExo complexados com anticorpo anti-CD9 (Figura 34), levou à diminuição da incorporação da molécula HLA-DR pelas células tumorais, reforçando a possibilidade de contribuição desta tetraspanina a adesão entre membranas.

As tetraspaninas, de modo geral, não possuem um receptor específico na superfície celular, entretanto, sua ação parece estar relacionada às interações com integrinas ou mesmo outras tetraspaninas, como com CD81 na formação de células gigantes (Hemler et al., 2005)

Outro aspecto interessante do papel de CD9 na biologia tumoral está relacionado ao potencial invasivo destas células. A alta expressão de CD9 em células tumorais parece estar relacionada com invasão, por favorecer a migração transendotelial de células de carcinoma cervical, bem com a linfangiogênese (Sauer et al., 2008). Em contraste, a baixa expressão de CD9 é correlacionada com tumores de alto potencial metastático (Miyake, et al., 1995; Zöller et al., 2008).

Assim como com CD9, a tetraspanina CD81, na maioria dos tratamentos com mExo, teve sua expressão diminuída nas células tumorais (Anexo C). Além de

sugerir um papel também para esta molécula na incorporação dos Exo, esta diminuição da expressão de CD81 nas células SK-BR-3, poderia também diminuir a ligação destas células com linfócitos T em ensaios de proliferação, uma vez que esta tetraspanina liga-se às moléculas CD4 e CD8 dos linfócitos T na sinapse imunológica (Maecker et al., 1997), como citado anteriormente.

Além de por citometria de fluxo, a incorporação dos mExo às células tumorais, foi confirmada por microscopia de fluorescência. Para tal, os exossomos de DCs foram previamente corados com lectinas marcadas com fluorocromo e então incubados por 8 horas com células tumorais. Ficou evidenciado na análise microscópica, que o marcador fluorescente passou às células tumorais após incubação com os Exo (Figura 33).

Demonstrada a capacidade dos mExo de modificar o fenótipo das células tumorais, foram iniciados os experimentos para determinar se essas alterações induziriam estimulação em linfócitos T alogênicos (aos mExo). Para tal, os linfócitos foram co-cultivados com as células tumorais SK-BR-3, tratadas ou não com mExo. Após 5 dias de co-culturas, os sobrenadantes foram coletados e analisados.

Um primeiro dado intrigante vem da análise da IL-10. Células tumorais que produzem espontaneamente IL-10, não têm esta produção afetada pelo tratamento com Exo. Por outro lado, a co-cultura destas células tumorais com linfócitos T alogênicos, levou a um aumento da citocina no sobrenadante (Figura 36). Finalmente, quando a co-cultura é realizada com células tumorais tratadas com Exo, o aumento da IL-10 é menor. Apesar da diferença ser pequena, é possível especular que o tratamento com exossomos de DCs, possa contribuir a uma eventual resposta efetora, pela diminuição da IL-10, uma vez que a presença desta citocina está mais associada com progressão tumoral e diminuição da ativação de linfócitos T (Mocellin et al., 2001; Moore et al., 1993)

Também a análise da produção de IL-6 forneceu dados interessantes. No caso desta molécula, as células tumorais tratadas ou não com Exo não a liberaram. Todavia, quando as células tumorais foram co-cultivadas com linfócitos T (que também não produziam IL-6), pode-se detectar esta citocina (Tabela 6). Embora esta produção não tenha sido notada em todos os experimentos e tenha mostrado uma cinética diferente dependendo do preparado de Exo, ela pode contribuir para a compreensão do fenômeno estudado. Esperava-se obter proliferação de linfócitos T, que, no entanto, não ocorreu. Em parte, a ausência de proliferação poderia estar

relacionada à produção de IL-6, que indiretamente, pode interferir na geração de uma resposta imune efetora contra as células tumorais, pela indução de proteínas supressoras (Alexander e Hilton et al., 2004) e até mesmo favorecendo o próprio crescimento tumoral (Lesina et al., 2011). Além disso, não pode ser descartada a secreção de IL-10 pelas próprias células tumorais (Figura 36), as quais muitas vezes mimetizam mecanismos utilizados pelo sistema imune para diminuir/suprimir a resposta antitumoral, com a geração de respostas adaptativas do tipo Th2 ou reguladoras (Tada et al., 1991; Yamamura et al., 1993).

Ainda outras estratégias foram tentadas para avaliar o possível potencial linfoestimulador das células SK-BR-3 tratadas com mExo alogênicos. Para tal, as nanovesículas foram complexadas com anticorpo anti-CD9, na tentativa de otimizar a incorporação, e assim, aumentar o potencial estimulador destas células. Esta abordagem resultou não no aumento de proliferação de linfócitos T alogênicos, mas sim na descoberta do provável envolvimento desta molécula na ligação dos Exo às células tumorais como discutido anteriormente.

Tentou-se também ampliar um possível efeito aloestimulador das células tumorais tratadas com mExo pela adição de IL-2 às co-culturas. Sabe-se que a IL-2 é uma importante citocina na resposta imune, tendo inclusive papel na terapia contra o câncer (Rosenberg et al., 1998; Villikka e Pyrhonen et al., 1996). Entretanto, não foi verificada proliferação dos linfócitos T alogênicos, mesmo em presença de IL-2 (Figura 40). Uma hipótese para esta ausência de proliferação, mesmo na presença de IL-2, poderia ser o consumo desta citocina por células T reguladoras, as quais podem ter sido geradas nas co-culturas, uma vez que é comum a presença destas células no meio tumoral (Zou, 2005). Sabe-se que linfócitos T reguladores expressam receptor de alta afinidade para IL-2, o que resulta no consumo competitivo com outros tipos de linfócitos, levando a diminuição da expansão de linfócitos T auxiliares, e a liberação de fatores supressores como TGF- β (Antony e Restifo, 2005; Zou, 2006).

Para investigar a hipótese de, nas co-culturas de células tumorais tratadas com mExo, haver produção de TGF- β por linfócitos T reguladores, bem como, avaliar se as próprias células tumorais estariam secretando este fator, e assim contribuindo para um ambiente imunossupressor, foi realizado ensaio com adição de

anticorpos neutralizadores (anti-TGF- β – 1 ng/ml) às co-culturas. Mesmo com estes anticorpos na co-cultura não foi observada proliferação linfocitária.

Assim, estes resultados nos fizeram refletir sobre a estratégia que estávamos utilizando para a indução de linfoestimulação. Optamos inicialmente por fazer ensaios alogênicos, para não se ter a necessidade de trabalhar com um antígeno tumoral específico e também pela alta capacidade estimuladora das moléculas do MHC para os linfócitos alogênicos. Células alogênicas expressam uma densidade alta (moléculas do MHC, principalmente de classe I, expressando peptídeos próprios) capaz de estimular os linfócitos T já num primeiro contato, o que ocorre, por exemplo, nos aloenxertos. No entanto, quando induzimos a expressão destas moléculas nas células SK-BR-3 por incorporação de Exo, a densidade de expressão de MHC na superfície celular não foi o “natural”, que seria capaz de estimular uma resposta alogênica (dados não mostrados), mas sim a equivalente à esperada na apresentação de um antígeno qualquer. Diante disso, resolvemos mudar de estratégia e delinear novo experimento com linfócitos T autólogos às DCs que originaram os Exo.

Assim, os linfócitos T foram submetidos à sensibilização *in vitro*, por DCs pulsadas ou não com exossomos tumorais (Tex), uma vez que Tex servem como fonte de antígenos tumorais para sensibilização de DCs (Wolfers et al., 2001). O tratamento das DCs com Tex resultou no aumento da expressão de moléculas de ativação, como CD80 e MHC-II (Figura 41). Decorridos 7 dias de cultura, os linfócitos sensibilizados foram co-cultivados com células tumorais, tratadas ou não com Exo de DCs alogênicas de diferentes doadores. Após 3 dias de co-cultura, os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à produção de citocinas. Novamente foi detectada a IL-10, embora em baixos níveis de IL-10 nas culturas entre linfócitos T e células tumorais (Figuras 44). Diferentemente do observado anteriormente, não houve redução da produção de IL-10, nas co-culturas com células tumorais tratadas com iExo ou mExo. Também foi analisada a produção de IFN- γ , a qual foi detectada no sobrenadante de todas as co-culturas, mas não houve diferença entre os diferentes grupos (Figura 43).

Mais uma vez, as células tumorais tratadas com iExo ou mExo não induziram a proliferação dos linfócitos T pré-sensibilizados. A ausência de proliferação, juntamente com a detecção de IL-10, está em concordância com os resultados

anteriores e reforçam ainda mais a idéia de um microambiente imunossupressor nas co-culturas, impedindo assim a possível estimulação do IFN- γ detectado.

Este protocolo de inicialmente sensibilizar linfócitos T com DCs autólogas pulsadas com Tex e então, cultivá-los com células tumorais tratadas com Exo alogênicos, foi baseado em resultados obtidos em nosso laboratório. Já foi demonstrado por nosso grupo que, a vacinação com DCs alogênicas fundidas com células tumorais de pacientes com câncer avançado, induziu nestes, respostas clínicas mensuráveis (Barbuto et al., 2004; Bergami-Santo et al., 2010). Assim, seria plausível pensar que alguns linfócitos (não *naïve*) de pacientes com câncer encontrando-se num estado de pré-sensibilização, ao interagirem com as DCs alogênicas fundidas às células tumorais, passassem a responder às mesmas. Esta possível resposta foi a que se buscou induzir com o protocolo usado.

Tendo falhado mais esta tentativa, novo protocolo foi delineado, desta vez em contexto inteiramente autólogo. Para tal, linfócitos T foram submetidos a dois ciclos de sensibilização (Figura 45). O primeiro ciclo foi em presença de DCs autólogas e o segundo com monócitos também autólogos, ambos pulsados com Tex. Após os dois ciclos de sensibilização, os linfócitos TCD3⁺ foram isolados das culturas e co-cultivados com células tumorais, tratadas ou não com Exo de DCs (dExo Ctrl) ou com Exo de DCs do grupo pulsado com Tex (dExo Tex). Decorridos 2 dias de co-culturas, os linfócitos T e os sobrenadantes foram coletados e analisados.

Nossos resultados demonstraram que os linfócitos T apenas quando sensibilizados contra antígenos tumorais, secretaram IL-6 após desafio com as células SK-BR-3 (Figura 47). Este resultado foi semelhante ao ocorrido nos ensaios de aloestimulação, onde a co-cultura de linfócitos T alogênicos com células tumorais tratadas com dExo levou a liberação de IL-6 (Tabela 6). A presença de IL-6 nas co-culturas autólogas é coerente com a alta expressão de SOCS3 nos linfócitos T sensibilizados e estimulados com as células SK-BR-3 tratadas com dExo Tex em comparação aos demais grupos (Figura 49). Sabe-se que a IL-6 é um excelente indutor de STAT3 (membro das proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição) e que por sua vez leva ao aumento de SOCS3 (*Suppressors of Cytokines Signaling*), que regula negativamente STAT3 (Alexander e Hilton, 2003; Lesina et al., 2011).

No entanto, SOCS3 também foi detectada nas co-culturas de células tumorais com linfócitos T não sensibilizados. Além do mais, nestas culturas o nível de SOCS3

foi ainda maior, em todas as condições tratadas. Neste caso não se pode implicar a IL-6, mas a IL-10 também é capaz de induzir a expressão de SOCS3 (Alexander e Hilton, 2004) e esta citocina é produzida pelas células tumorais.

Embora, aparentemente contraditórios estes dados poderiam ser interpretados como indicador de que a sensibilização *in vitro* dos linfócitos T teve, de fato, efeito modificante na resposta dos linfócitos sensibilizados às células tumorais.

Interessantemente, além da produção de IL-6 nos ensaios autólogos, também verificamos que os linfócitos T sensibilizados contra antígenos tumorais apresentaram maior número de células produtoras de IFN- γ , principalmente pelo desafio com as células SK-BR-3 tratadas com dExo Tex ($p < 0,05$, Figura 48). Sabe-se que o IFN- γ é secretado principalmente por linfócitos T auxiliares e apresenta um importante papel na resposta imune antitumoral, via ativação de STAT1, o qual induz a transcrição de vários genes envolvidos na resposta imune efetora de padrão Th1 (Brandacher et al., 2006; Schindler et al., 2007). É interessante notar que IL-6, IL-10 e IFN- γ são descritos como indutores de SOCS3 (Bluyssen et al., 2010; Yu et al., 2009).

Assim, temos uma situação em que são detectadas três citocinas, todas capazes de induzir uma resposta reguladora nas células (SOCS3), mas onde uma é indutora de “resposta” (IFN- γ) e duas têm papel regulador (IL-6 e IL-10). Portanto, não é totalmente surpreendente que apesar da presença de IFN- γ , não se tenha observado outros parâmetros indicadores da resposta linfocitária às células tumorais. De fato, SOCS3 pode bloquear a translocação de STAT1 para o núcleo (induzida por IFN- γ) e assim, inibir a resposta a esta citocina (Song e Shuai, 1998).

Outro mecanismo pelo qual a expressão de SOCS3 poderia impedir a resposta dos linfócitos T sensibilizados às células tumorais pode ainda ser mencionado. Já foi descrito que SOCS3 pode inibir a produção de IL-2 em linfócitos T auxiliares, através da ligação do domínio SH₂ da proteína SOCS3 com a molécula CD28, impedindo assim, o sinal co-estimulador desta (Matsumoto et al., 2003). A deprivação de IL-2 no meio pode reduzir a sobrevivência, diferenciação e ativação de linfócitos T auxiliares (Smith KA, 1988).

Vale salientar que apesar de termos avaliada a expressão de SOCS3 em apenas um dos experimentos, as variações observadas ajudaram a tentar compreender e explicar os demais resultados obtidos.

Utilizamos exossomos originados das células SK-BR-3 para pulsar as DCs. Entretanto, apesar das DCs pulsadas com Tex apresentarem maior expressão de moléculas envolvidas na ativação linfocitária (Figura 41), não havia garantia de que a resposta gerada nas co-culturas de sensibilização de linfócitos seria de padrão efetor. Se por um lado, há relato de que Exo de tumores servem como fonte de antígenos e, ainda são capazes de induzir uma resposta antitumoral (Wolfers et al., 2001), por outro lado, há um número crescente de trabalhos que apontam para uma atividade supressora destas nanovesículas (Abusamra et al., 2005; Pant et al., 2012; Szajnik et al., 2010; Valenti et al., 2007; Xiang et al., 2009), o que parece ter acontecido em nossos experimentos. Exossomos tumorais podem carregar várias citocinas e fatores de crescimento como, IL-10 e TGF- β , bem como pSTAT3, que podem afetar negativamente a resposta imune efetora (Pant et al., 2012; Szajnik et al., 2010; Xiang et al., 2009).

Assim, tentando eliminar este possível efeito supressor de exossomos tumorais nas co-culturas de sensibilização, resolvemos utilizar a proteína quimérica Her-2/neu-Fc para pulsar as DCs e os monócitos autólogos (Figura 50).

Mesmo com esta mudança, os linfócitos T sensibilizados não apresentaram citotoxicidade contra as células tumorais tratadas com dExo. Também não foi detectada indução de proliferação de linfócitos T ou produção de IFN- γ . Interessantemente, esta ausência de proliferação foi mais uma vez acompanhada de altos níveis de IL-6 (Figura 54). Como já discutido acima, a IL-6 é uma citocina inflamatória, que atua frequentemente favorecendo a progressão tumoral (Alexander e Hilton, et al., 2004; Grivennikov et al., 2009; Lesina et al., 2011).

Outro fator a ser considerado é a liberação de exossomos pelas células SK-BR-3 ao longo dos 5 dias de co-cultura. Estes, através dos mecanismos já citados e também de sua capacidade de induzir apoptose de linfócitos TCD8⁺ (Abusamra et al., 2005), podem ter impedido o desenvolvimento da resposta que buscávamos. É interessante notar que a irradiação a que as células tumorais foram submetidas pode ter contribuído ainda mais para esta possível supressão. Há relatos de que células tumorais expostas à radiação UV e a estresse tem aumento significativo da liberação de Exo (Pant et al., 2012). Assim, a irradiação γ poderia também ter efeito semelhante e, desta forma, contribuir para o bloqueio da ativação dos linfócitos T pelas células tumorais tratadas com dExo.

Diferentemente, linfócitos T sensibilizados contra BSA apresentaram citotoxicidade sobre as células tumorais tratadas com dExo Crl ou dExo BSA (Figura 52), o que seria contraditório com a não expressão de MHC de classe I pelas células tumorais. Entretanto, é preciso lembrar que analisamos a expressão de MHC-I com um anticorpo capaz de reagir com HLA-A, HLA-B e HLA-C, método que talvez não fosse suficientemente sensível para detectar a expressão de uma destas moléculas em baixos níveis. De fato, é descrito na literatura, que as células SK-BR-3 apresentam baixos níveis de HLA-A (Placke et al., 2012).

Portanto, o que poderia ter ocorrido em nossas culturas, seria uma sensibilização dos linfócitos T contra o BSA apresentado no contexto das moléculas de classe I do MHC, expressas pelas células tumorais. Isto poderia ter ocorrido pela alta capacidade de sensibilização das DCs e pela presença abundante de BSA no meio de cultura (mesmo nas culturas controle), uma vez que usamos soro fetal bovino.

De modo geral, nossos resultados demonstraram que células tumorais podem incorporar exossomos oriundos de células do sistema imune. Esta incorporação gerou alterações fenotípicas na membrana das células tumorais, que em contexto autólogo induziram aumento de linfócitos produtores de IFN- γ , quando estes foram previamente sensibilizados contra antígenos tumorais. Entretanto, ao que tudo indica a presença de fatores liberados pelas células tumorais, senão mesmo os exossomos liberados pelas mesmas, podem ter contribuído para o bloqueio (parcial) da resposta, resultando na ausência de proliferação e de ação citotóxica de linfócitos T frente às células tumorais.

Assim, concluímos que embora não tendo conseguido conferir imunogenicidade completa às células tumorais pelo seu tratamento com Exo derivados de DCs, obtivemos dados que justificam a continuidade de esforços neste sentido.

6 CONCLUSÕES

Nosso trabalho mostrou que da forma utilizada, o tratamento com Exo derivados de DCs não foi capaz de conferir imunogenicidade indiscutível às células tumorais.

Especificamente concluímos que:

- os exossomos obtidos de DCs expressavam os marcadores compartilhados com as células de origem: HLA-ABC, HLA-DR, CD86, CD11c, CD9, CD81, CD18 e CD54;
- o tratamento das células SK-BR-3 com mExo, levou a transferência de material oriundo das nanovesículas (principalmente HLA-DR e CD86) e a modulação dos níveis de CD54, CD9 e CD8, moléculas já presentes nas células tumorais;
- as células tumorais tratadas com Exo de DCs não foram capazes de induzir proliferação de linfócitos T alogênicos, entretanto, induziu a produção das citocinas IL-10 e IL-6;
- as células tumorais tratadas com Exo de DCs não foram capazes de induzir proliferação e citotoxicidade de linfócitos T autólogos sensibilizados contra antígenos tumorais, entretanto, induziram a produção de IL-6 e aumentaram o número de linfócitos produtores de IFN- γ ;
- as células tumorais tratadas com Exo de DCs também foram capazes de induzir aumento da expressão de SOCS3 em linfócitos T autólogos sensibilizados contra antígenos tumorais, contribuindo, talvez, para a ausência de resposta efetora contra as mesmas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576p.
- Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(2):169-73.
- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997;387(6634):713-7.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392(6671):86-9.
- Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:503-29.
- Andre F, Escudier B, Angevin E, Tursz T, Zitvogel L. Exosomes for cancer immunotherapy. *Ann Oncol*. 2004;15 (Suppl 4):141-4.
- Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 1985;121(3):531-51.
- Antony PA, Restifo NP. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother*. 2005;28(2):120-8.
- Arina A, Tirapu I, Alfaro C, Rodriguez-Calvillo M, Mazzolini G, Inoges S, et al. Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells. exploiting cross-priming. *Exp Hematol*. 2002;30(12):1355-64.
- Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med*. 1997;186(7):1177-82.
- Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*. 2011;2:180. doi: 10.1038/ncomms1180.
- Baleeiro RB, Barbuto JA. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism. *Mol Immunol*. 2008;45(12):3502-4.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
- Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer. Immunol Immunother*. 2004;53(12):1111-8.
- Barbuto JAM. Imunologia do câncer. In: Younes RN; Birolini D. Bases fisiopatológicas da cirurgia moderna. São Paulo:Lemar; 1999. p. 481-90.
- Bergami-Santos PC, Cristófani L, Odone Filho V, Barbuto JAM. Dendritic-tumor cell hybrids in therapeutic vaccination against advanced neuroblastoma. In: _____ Cancer immunology and immunotherapy: building on success [Congress]. Bethesda-MD: National Institutes of Health; 2011.
- Berwin B, Nicchitta CV. To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells. *Traffic*. 2001;2(10):690-7.
- Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 1976;143(5):1283-8.
- Binder RJ, Anderson KM, Basu S, Srivastava PK. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol*. 2000b;165(11):6029-35.
- Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol*. 2000a;1(2):151-5.
- Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, et al. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med*. 1997;186(8):1315-22.
- Bluyssen HA, Rastmanesh MM, Tilburgs C, Jie K, Wesseling S, Goumans MJ, et al. IFN gamma-dependent SOCS3 expression inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation and differentially affects IL-6 mediated transcriptional responses in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(2):C354-C62.
- Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1996;184(2):465-72.
- Brandacher G, Winkler C, Schroecksnadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab*. 2006;7(6):599-612.
- Buschow SI, Liefhebber JM, Wubbolts R, Stoorvogel W. Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(3):398-403.

- Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, et al. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med*. 2000;191(11):1957-64.
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994;180(4):1263-72.
- Chandawarkar RY, Wagh MS, Srivastava PK. The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *J Exp Med*. 1999;189(9):1437-42.
- Chaput N, Scharzt NE, Andre F, Taieb J, Novault S, Bonnaventure P, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol*. 2004;172(4):2137-46.
- Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol*. 2003;171(5):2262-9.
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*. 2000;1(6):510-4.
- Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001;247(1-2):163-74.
- Davis DM. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(3):238-43.
- Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000b;165(3):1259-65.
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000a;113:3365-74.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(8):3539-43.
- Gerlini G, Mariotti G, Chiarugi A, Di Gennaro P, Caporale R, Parenti A, et al. Induction of CD83+CD14+ nondendritic antigen-presenting cells by exposure of monocytes to IFN- α . *J Immunol*. 2008;181(5):2999-3008.

Gong J, Nikrui N, Chen D, Koido S, Wu Z, Tanaka Y, et al. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol*. 2000;165(3):1705-11.

Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, et al. Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(11):6279-83.

Gong J, Chen L, Chen D, Kashiwaba M, Manome Y, Tanaka T, et al. Induction of antigen-specific antitumor immunity with adenovirus-transduced dendritic cells. *Gene Ther*. 1997;4(10):1023-8.

Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13. Erratum in: *Cancer Cell*. 2009;15(3):241.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.

Hao S, Bai O, Fan Li, Jinying Y, Laferte S, Xiang J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology*. 2006b;120:90-102.

Hao S, Bai O, Yuan J, Qureshi M, Xiang J. Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. *Cell Mol Immunol*. 2006a;3(3):205-11.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-9.

Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(10):801-11.

Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansén S, von Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D, et al. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8⁺ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood*. 2006;107(4):1528-36.

Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD. In vitro methods for generating CD8⁺ T-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire. *J Immunol Methods*. 2006;310(1-2):40-52.

Hu J, Winqvist O, Flores-Morales A, Wikström AC, Norstedt G. SOCS2 influences LPS induced human monocyte-derived dendritic cell maturation. *PLoS One*. 2009;4(9):e7178.

Hughes GC, Clark EA. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007;40(6):470-81.

- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412-20.
- Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Ono K, Matsushima K, Saaristo A, et al. Free in PMC Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1263-70.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704p.
- Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One*. 2011;6(9):e24234.
- Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Bevec D, Kuhnt C, Steinkasserer A, et al. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med*. 2000;191(9):1581-90.
- Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med*. 2000;6(3):332-6.
- Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, Hirohashi Y, et al. Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol*. 2007;179(3):1803-13.
- Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*. 2008;18(5):199-209.
- Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, et al. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2002;270(2):211-26.
- Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*. 2011;19(4):456-69.
- Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):45-51.
- Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2):147-54.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*. 1997;11(6):428-42.

- Marcusson-Ståhl M, Cederbrant K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. *Toxicology*. 2003;193(3):269-79.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73(10):1907-20.
- Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009;9(21):4997-5000.
- Mehrotra S, Stevens R, Zengou R, Chakraborty NG, Butterfield LH, Economou JS, et al. Regulation of melanoma epitope-specific cytolytic T lymphocyte response by immature and activated dendritic cells, *in vitro*. *Cancer Res*. 2003;63(17):5607-14.
- Melero I, Arina A, Murillo O, Dubrot J, Alfaro C, Perez-Gracia JL, et al. Immunogenic cell death and cross-priming are reaching the clinical immunotherapy arena. *Clin Cancer Res*. 2006;12(8):2385-9.
- Mignot G, Roux S, Thery C, Segura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):376-88.
- Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, et al. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res*. 1995;55(18):4127-31.
- Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother*. 2001;24(5):392-407.
- Mohamadzadeh M, Luftig R. Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2004;2(1):1-11.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.
- Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*. 1996;29(6):371-80.
- Néron S, Thibault L, Dussault N, Côté G, Ducas E, Pineault N, et al. Characterization of mononuclear cells remaining in the leukoreduction system chambers of apheresis instruments after routine platelet collection: a new source of viable human blood cells. *Transfusion*. 2007;47(6):1042-9.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998;4(3):328-32.
- Neves AR. Efeito da temperatura febril sobre o fenótipo e função de células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos. [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

- Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Camara-Lopes LH, et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(1):61-6.
- Nolte-'t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood.* 2009;113(9):1977-81.
- Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1997;27(1):280-8.
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol.* 1998;160(9):4587-95.
- Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2012. [Epub ahead of print].
- Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012;72(2):440-8.
- Porgador A, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;182(1):255-60.
- Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Kummer M, Steinkasserer A. Small interfering RNA (siRNA) delivery into monocyte-derived dendritic cells by electroporation. *J Immunol Methods.* 2006;311(1-2):139-52.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol.* 2000;165(1):566-72.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-72.
- Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg.* 1998;228:307-19.
- Roth C, Rochlitz C, Kourilsky P. Immune response against tumors. *Adv Immunol.* 1994;57:281-351.

- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 1999;29(5):1617-25.
- Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clin Cancer Res.* 2003;9(17):6426-31.
- Saxon A, Feldhau J, Robins. Single step separation of human T and B cells using AET treated srbc rosettes. *J Immunol Methods.* 1976;12:285-8.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20059-63.
- Segura E, Guérin C, Hogg N, Amigorena S, Théry C. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol.* 2007;179(3):1489-96.
- Segura E, Amigorena S, Thery C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(2):89-93.
- Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N, Schoenberger SP, et al. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med.* 2000;191(11):1965-74.
- Skokos D, Le Panse S, Villa I, Rousselle JC, Peronet R, David B, et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J Immunol.* 2001;166(2):868-76.
- Smith KA. Interleukin-2 inception, impact, and implications. *Science.* 1988;240:1169-76.
- Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem.* 1998;273(52):35056-62.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161(3):1083-6.
- Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):185-94.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.

- Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, Amin A, Hueman MT, Ponniah S, et al. Quantification and phenotypic characterization of circulating tumor cells for monitoring response to a preventive HER2/neu vaccine-based immunotherapy for breast cancer: a pilot study. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(12):3359-68.
- Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*. 2010;5(7):e11469.
- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, et al. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*. 1991;146(3):1077-82.
- Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*. 1997;278(5335):117-20.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569-79.
- Théry C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166(12):7309-18.
- Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*. 1999;147(3):599-610.
- Unternaehrer JJ, Chow A, Pypaert M, Inaba K, Mellman I. The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):234-9.
- Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res*. 2007;67(7):2912-5.
- van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2606-15. Erratum in: *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(2):655.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 2006;140(1):13-21.
- Viaud S, Ploix S, Lapierre V, Théry C, Commere PH, Tramalloni D, et al., Updated technology to produce highly immunogenic dendritic cell-derived exosomes of clinical grade: a critical role of interferon- γ . *J Immunother*. 2011;34(1):65-75.
- Viaud S, Théry C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res*. 2010;70(4):1281-5.

- Villikka K, Pyrhönen S. Cytokine therapy of malignant melanoma. *Ann Med.* 1996;28(3):227-33.
- Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, Cheng Z, et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer.* 2009;124(11):2621-33.
- Wang HH, Mao CY, Teng LS, Cao J. Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006;5(1):22-7.
- Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Invest New Drugs.* 2003;21:21-32.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001;7(3):297-303.
- Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature.* 2010;464(7290):864-9.
- Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest.* 1993;91(3):1005-10.
- Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol.* 1998;161(6):3096-102.
- Yang Y, Xiu F, Cai Z, Wang J, Wang Q, Fu Y, et al. Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(6):389-99.
- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.
- Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):174-81.
- Zar JH. *Biostatistical analysis.* Fourth Edition. New Jersey: Prentice Hall. 1999; 663 p.
- Zhou BP, Li Y, Hung MC. HER-2/Neu signaling and therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Dis.* 2002;15:13-24.
- Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154(8):3821-35.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* 1998;4(5):594-600.

Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):40-55.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295-307.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):263-74.

ANEXOS

Anexo A - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores CD14, CD11c, CD1a e CD123 em monócitos, iDCs e mDCs

Os monócitos foram obtidos a partir de seleção para a molécula CD14 e diferenciados em iDCs, as quais foram pulsadas ou não com Tex e estimuladas com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE $_2$). Após obtenção da mDCs, estas foram fenotipadas por citometria de fluxo. Para a molécula CD14, a análise foi realizada dentro do *gate* baseado em tamanho (FSC) e granulidade (SSC). Para as demais moléculas, as análises foram realizadas englobando as células que no *gate* FSCxSSC eram CD14 $^{+}$, para monócitos e HLA-DR $^{+}$ /*linhagens negativas*, para mDCs. Análise estatística utilizando-se ANOVA, seguido do Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas, ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05. Em alguns casos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido teste de Dunn para comparações múltiplas, *p<0,05.

FONTE: Romagnoli (2012)

Anexo B - Frequência células e Intensidade Mediana de Fluorescência dos marcadores HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83 em monócitos, iDCs e mDCs.

Os monócitos foram obtidos a partir de seleção para a molécula CD14 e diferenciados em iDCs, as quais foram pulsadas ou não com Tex e estimuladas com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂). Após obtenção da mDCs, estas foram fenotipadas por citometria de fluxo. As análises foram realizadas englobando as células que no *gate* FSCxSSC eram CD14⁺, para monócitos e HLA-DR⁺/*linhagens negativas*, para mDCs. Análise estatística utilizando-se ANOVA, seguido do Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas, ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05. Em alguns casos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido teste de Dunn para comparações múltiplas, *p<0,05.

FONTE: Romagnoli (2012)

Anexo C - Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas CD9, CD81, CD54 e CD11c na superfície das células tumorais após tratamento com dExo.

		MFI		
		SK-BR-3 +		
	experimentos	sem dExo	dExo Ctrl	dExo Tex
CD9	1	3553	2823	2936
	2	3553	2125	2793
	3	3553	2220	2750
	4	2283	1558	1761
CD81	1	11174	7335	7959
	2	11174	7806	8323
CD54	1	481	513	645
	2	409	705	544
	3	409	295	297
CD11c	1	115	156	160
	2	115	174	173
	3	115	174	175

As células tumorais SK-BR-3 foram tratadas ou não com exossomos obtidos de mDCs do grupo controle (dExo Ctrl) ou do grupo pulsado com Tex (dExo Tex), por 8 horas. Após este período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos e analisadas por citometria de fluxo. A análise foi realizada dentro do gate baseado no tamanho e na granulosidade das células da linhagem de adenocarcinoma mamário, SK-BR-3. Histogramas superiores são representativos das marcações encontradas das moléculas analisadas. A linha azul representa as células tratadas com dExo Tex, a linha vermelha as células tratadas com dExo Ctrl e a linha preta representa as células não tratadas. Abaixo, tabela com os valores das Intensidades Medianas de Fluorescência das moléculas analisadas, antes e após tratamento das células tumorais com diferentes preparados de exossomos (representados por experimentos).

FONTE: Romagnoli (2012)