



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRUNO DELTREGGIA BENITES

**EXOSSOMOS, MICRORNAS E CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPLICAÇÕES NO
PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS**

CAMPINAS

2019

BRUNO DELTREGGIA BENITES

EXOSSOMOS, MICRORNAS E CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPLICAÇÕES NO
PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na Área de
Clínica Médica.

ORIENTADOR: SARA TERESINHA OLALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO BRUNO DELTREGGIA BENITES, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B437e Benites, Bruno Deltreggia, 1984-
Exossomos, microRNAs e células dendríticas: implicações no prognóstico e tratamento das neoplasias hematológicas / Bruno Deltreggia Benites. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Exossomos. 2. Células dendríticas. 3. microRNAs. 4. Leucemia mieloide aguda. 5. Síndromes mielodisplásicas. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Exosomes, microRNAs and dendritic cells: implications for the prognosis and treatment of hematological neoplasms

Palavras-chave em inglês:

Exosomes

Dendritic cells

microRNAs

Acute myeloid leukemia

Myelodysplastic syndromes

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Margareth Castro Ozelo

Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

José Alexandre Marzagão Barbuto

Data de defesa: 22-11-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3985-5690>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9019734699141355>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

BRUNO DELTREGGIA BENITES

ORIENTADOR: SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD**
- 2. PROFA. DRA. MARGARETH CASTRO OZELO**
- 3. PROFA. DRA. KÁTIA BORGIA BARBOSA PAGNANO**
- 4. PROFA. DRA. MARIA CAROLINA DE OLIVEIRA RODRIGUES**
- 5. PROF. DR. JOSÉ ALEXANDRE MARZAGÃO BARBUTO**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [22/11/2019]

“Há muito tempo chegara à minha atenção que as pessoas de realizações raramente sentaram-se e deixaram as coisas acontecerem com elas. Elas saíram e aconteceram para as coisas.”

Leonardo da Vinci
(1452 – 1519)

AGRADECIMENTOS

Fui muito feliz em contar com a ajuda técnica de inúmeras pessoas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, e corro o risco de ser injusto ao nomear especificamente algumas delas. Mas registro meu sincero agradecimento àquelas que se tornaram especialmente importantes para sua conclusão.

Dentre elas, Marisa Alvarez, Tereza Sueko, Irene Santos, Karla Ferro, Fernanda Nienmann e Raquel Foglio, pelo suporte em várias etapas deste trabalho e por tornarem também o ambiente de nosso laboratório fluido e prazeroso.

Agradeço a Lígia Nunes e a Profa. Eneida de Paula, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, pela disponibilização de seu laboratório e de seus conhecimentos técnicos, além da rapidez na análise conjunta dos resultados.

Algumas pessoas tiveram um papel ainda mais especial. Nesse sentido, meu profundo agradecimento à Adriana Duarte, que graças a sua determinação e persistência, foi a maior responsável pela padronização das culturas de células dendríticas em nosso laboratório, possibilitando não só o desenvolvimento deste projeto, mas também a produção das vacinas que têm sido aplicadas nos pacientes desde 2016.

Agradeço à Simone Gilli, que apesar de não ter participado diretamente neste trabalho, tem me orientado nestes últimos anos em tantos outros projetos e sempre me deu tantas dicas importantes na área de pesquisa e na minha vida como hematologista. Além das várias risadas que amenizaram muito os momentos mais complicados.

E certamente meu agradecimento especial dirige-se à Sarita, por essas quase duas décadas de orientação e oportunidades. Foi certamente a maior responsável pelo meu interesse pela pesquisa e meu grande exemplo de médica, pesquisadora e professora. Agradeço especialmente pela generosidade em impulsionar nossos projetos e minha própria carreira, de tantas possíveis maneiras.

É realmente uma grande honra poder trabalhar com tantas mulheres incríveis.

Além dos limites do Hemocentro, agradeço a minha família e amigos, pelo apoio e sustentação desde sempre. Certamente meus pais no topo dessa lista, por

terem tornando o caminho mais fácil em cada detalhe em que eles viram isso ser possível. Esse tipo de realização não acontece de um dia para o outro, e certamente depende de investimentos e incentivos que permitam um adulto realizar o que sua criança um dia sonhou. Desde as “experiências” com os restos de geladeira da vó Flora até o microscópio de brinquedo, presente do tio Zé antes mesmo de eu saber o que era uma célula.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que contribuíram com seu tempo e sua disponibilidade em ajudar no desenvolvimento de novas perspectivas de tratamento. A eles continuarei dedicando minhas ideias e meu trabalho.

RESUMO

Exossomos são nanopartículas importantes na comunicação intercelular, carregando conteúdos de proteínas, RNAs e microRNAs que recapitulam as células de origem. Assim, poderiam ser úteis como pulso antigênico no desenvolvimento de novas formas de imunoterapia, e análise de seu conteúdo interno poderia representar uma interessante ferramenta prognóstica. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de exossomos extraídos do soro de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e síndromes mielodisplásicas (SMD) como fonte antigênica para células dendríticas (DC) e os efeitos sobre a citotoxicidade antitumoral. Além disso, os níveis de expressão de mir-223, importante microRNA no sistema hematopoiético, foram avaliados nos exossomos e correlacionados com dados clínicos e laboratoriais, com o intuito de também explorar seu potencial uso prognóstico nessas doenças. Sangue venoso foi obtido de 14 pacientes com LMA, 28 pacientes com SMD e 19 controles saudáveis. Exossomos foram isolados usando método ExoQuick®; sua concentração e distribuição de tamanho foram caracterizadas por Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight, UK). Os níveis de expressão de mir-223 e mir-192 (controle endógeno) foram avaliados por RT-PCR. Para os estudos de citotoxicidade, 100µL da suspensão de exossomos (aproximadamente 10^{15} nanopartículas) foram incubados com DCs maduras ou imaturas e a citotoxicidade direta ou dependente de linfócitos foi avaliada pela porcentagem de lise específica de células leucêmicas K562 nas coculturas, comparado a situações de DCs não pulsadas. A concentração de exossomos nas amostras de soro variou de $5,6 \times 10^{11}$ a $3,3 \times 10^{13}$ partículas por µl de suspensão, com concentrações significativamente menores nas amostras de pacientes em relação aos indivíduos saudáveis ($p= 0,004$). Diminuição significativa na expressão de mir-223 foi observada em exossomos de indivíduos com SMD de alto risco em comparação com controles ($p= 0,002$) e doença de baixo risco ($p= 0,012$). Curiosamente, houve correlação positiva significativa entre expressão de mir-223 exossomal e contagens de: leucócitos totais (r_s de Spearman = 0,37, $p = 0,003$), neutrófilos ($r_s= 0,392$, $p = 0,002$), monócitos ($r_s= 0,484$, $p <0,001$), linfócitos ($r_s= 0,442$, $p <0,001$) e plaquetas ($r_s= 0,387$, $p = 0,002$). A diferenciação granulocítica-monocítica de células CD34+ humanas normais revelou aumento de 8 vezes na expressão de mir-223 nessas células após 14 dias de cultura. Em relação aos estudos citotóxicos,

surpreendentemente, a incubação de exossomos de pacientes com DCs diminuiu a lise das células-alvo, provavelmente correspondendo a mecanismo de evasão tumoral *in vivo*. No entanto, quando DCs imaturas foram pulsadas com exossomos purificados de sobrenadantes de culturas de K562 ou lisados dessas células, a lise de células alvo foi notavelmente aumentada, associada a aumento substancial na expressão do marcador de maturação CD83. Portanto, o desenvolvimento de vacinas usando exossomos de pacientes provavelmente não acrescentaria benefícios ao tratamento da LMA; alternativamente, exossomos de células em cultura ou lisados celulares podem representar formas eficazes de maturar DCs em fenótipo citotóxico, sem a imunossupressão observada com exossomos dos pacientes. Além disso, mir-223 está suprimido em pacientes com SMD de alto risco e correlaciona-se com as contagens celulares tanto em SMD quanto LMA. Como os níveis de mir-223 aumentam progressivamente durante a diferenciação granulocítica-monocítica, especulamos que mir-223 pode representar um marcador de diferenciação residual normal.

Palavras-chave: Exossomos, células dendríticas, microRNAs, leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicas.

ABSTRACT

Exosomes are nanoparticles with important intercellular communication functions, carrying proteins, RNAs and microRNAs which are dependent on the cells of origin. Thus, they could be useful as antigenic pulse in the development of new forms of immunotherapy, and the analysis of their microRNAs contents could represent a more accessible prognostic tool. The objective of this study was to evaluate the use of exosomes extracted from serum of patients with acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) as an antigenic source for dendritic cell (DC) and the effects upon antitumor cytotoxicity. Furthermore, expression levels of exosomal mir-223, an important microRNA in the hematopoietic system, were correlated to clinical and laboratorial data. Venous blood was obtained from 14 patients with AML, 28 patients with MDS and 19 healthy controls. Exosomes were isolated using the ExoQuick® precipitation solution; their concentration and size distribution were characterized by Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight, UK). Expression levels of mir-223 and mir-192 (endogenous control) were assessed by RT-PCR using specific primers. For cytotoxic studies, 100 μ L of the suspension of exosomes (approximately 10^{15} nanoparticles) were incubated with mature or immature DCs in culture and direct or lymphocyte-dependent cytotoxicity was assessed by the percentage of specific lysis of K562 leukemic cells in co-cultures, compared to that of non-pulsed DCs, and analyzed by immunophenotyping. The concentration of exosomes in serum samples ranged from 5.6×10^{11} to 3.3×10^{13} particles per μ l of suspension, with significantly lower concentrations in the patient's samples in relation to healthy individuals ($p=0.004$). A significant decrease in the expression of mir-223 was observed in exosomes from individuals with high-risk MDS compared to controls ($p=0.002$) and to patients with low-risk MDS ($p=0.012$). Interestingly, in the total group of patients, there was a significant positive correlation between the expression of exosomal mir-223 and counting of: total leukocytes (Spearman's $r_s=0.37$, $p=0.003$), neutrophils ($r_s=0.392$, $p=0.002$), monocytes ($r_s=0.484$, $p<.001$), lymphocytes ($r_s=0.442$, $p<.001$) and platelets ($r_s=0.387$, $p=0.002$) in peripheral blood. We then performed granulocytic-monocytic differentiation of normal human CD34+ cells and observed an 8-fold increase in mir-223 expression in cultured cells after 14 days of culture. Regarding the cytotoxic studies, surprisingly, incubation of patients' exosomes with DCs decreased

lysis of target cells, which may correspond to a mechanism of tumor evasion *in vivo*. However, when immature DCs were pulsed with exosomes purified from K562 culture supernatants or K562 cell lysates, the lysis of target cells was notably enhanced, associated with a substantial increase in the expression of the maturation marker CD83. Thus, the development of vaccines using patients' exosomes would probably add no benefits to the treatment of AML; alternatively, exosomes from cultured cells or whole cell lysates may represent effective ways for maturing DCs into a cytotoxic phenotype, without the immunosuppression observed with patients' exosomes. Furthermore, mir-223 is suppressed in exosomes of patients with high-risk MDS and correlate with cell counts in both MDS and AML. As mir-223 levels progressively increase during normal granulocytic-monocytic differentiation, we speculate that mir-223 may represent a marker of residual normal differentiation.

Keywords: Exosomes; dendritic cells; microRNAs; acute myeloid leucemia; myelodysplastic syndromes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDC: Células dendríticas convencionais

DCs: Células dendríticas (*dendritic cells*)

DECH: Doença do enxerto contra hospedeiro

DRM: Doença residual mínima

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GvHD: Graft versus host disease

GvL: Graft versus leukemia

IL: Interleucina

IFN: Interferon

IPSS: International Prognostic Scoring System

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

MDSCs: Myeloid derived supressor cells

MHC: Major histocompatibilty complex (Complexo de Histocompatibilidade principal)

MVB: Multivesicular bodies (corpos multivesiculares endosomais)

NK: Natural Killer

pDC: Células dendríticas plasmocitóides

PGE2: Prostaglandina E2

RISC: RNA-induced silencing complex

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

SMD: Síndromes Mielodisplásicas

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas

TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

WT1: Wilms Tumor 1

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Potencial do uso de vacinas de células dendríticas no tratamento das neoplasias mielóides	22
A busca por novas formas de pulso antigênico para imunoterapia: exossomos	29
Exossomos: métodos de purificação e análise de microRNAs no contexto de biópsia líquida e medicina personalizada	32
OBJETIVOS	37
Objetivos específicos	37
METODOLOGIA	38
Casuística e coleta de amostras	39
Isolamento e caracterização estrutural dos exossomos nas amostras	39
Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real.	40
Geração de células dendríticas, análise fenotípica e pulso antigênico em culturas	40
Culturas de K562, lisados celulares e precipitação de exossomos dos sobrenadantes de culturas	41
Ensaio de citotoxicidade	42
Ensaio de diferenciação celular granulocítica-monocítica	42
Análise estatística	43
RESULTADOS	43
Caracterização estrutural dos exossomos extraídos de soro de pacientes e controles normais	43
Padronização de mir-192 como controle endógeno para RT-PCR	45
Avaliação da expressão de mir-223 e mir-22 em controles e pacientes e sua relação com dados clínicos e laboratoriais	47
Papel de mir-22 e mir-223 na diferenciação monocítica-granulocítica normal	48
Exploração dos exossomos como nova fonte de pulso antigênico para imunoterapia com células dendríticas	51
Os exossomos derivados de AML são efetivamente internalizados em DCs e suprimem a citotoxicidade de maneira dose-dependente	51
Exossomos derivados de LMA suprimem a citotoxicidade mediada por DCs contra células K562, ao contrário dos lisados de K562 e dos exossomos isolados de sobrenadantes de culturas de K562	54
Avaliação do efeito de diferentes condições de pulso na maturação de DCs, proliferação de linfócitos e secreção de IFN- γ	55
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	65
PLANEJAMENTO FUTURO	65

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ALUNO NO PERÍODO DO ESTUDO.....	65
Específica deste projeto	66
Artigos científicos.....	66
Apresentações de trabalho em congressos	66
Geral	67
Artigos científicos.....	67
Apresentações de trabalho em congressos	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	84
Aprovação pelo Comitê de Ética Médica institucional.....	85
Artigo publicado	90

INTRODUÇÃO

Os últimos anos têm testemunhado avanços substanciais no entendimento das alterações genéticas que levam ao surgimento e proliferação das células neoplásicas. Esses novos conhecimentos foram possíveis graças ao desenvolvimento de ensaios laboratoriais extremamente robustos, dentre eles as técnicas envolvendo genômica e proteômica. Esse progresso foi particularmente perceptível no campo das neoplasias hematológicas: hoje estão descritos a fundo inúmeros desarranjos genéticos e padrões moleculares que levam à ocorrência das leucemias mieloides agudas e das síndromes mielodisplásias, tornando-se inclusive importantes marcadores de agressividade e prognóstico nessas doenças. (1,2)

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) correspondem na verdade a um conjunto de desordens clonais da célula tronco hematopoiética, que como grupo têm como denominador comum a hematopoiese ineficaz. Esta pode ser caracterizada por alta proliferação celular na medula óssea, porém com displasias celulares significativas que levam a citopenias no sangue periférico e suas consequências clínicas, como anemia, sangramentos e susceptibilidade a infecções. Além disso, há acúmulo progressivo de blastos, que são células tronco indiferenciadas afetadas por mutações da doença e que perdem seu controle de proliferação e sua capacidade de diferenciação nas diversas linhagens sanguíneas. O diagnóstico é realizado através da avaliação conjunta de histologia, imunofenotipagem e citogenética, e os pacientes são classificados em categorias de risco através de escores prognósticos. (3) Dentre eles, o que mais tem sido utilizado na prática clínica e em ensaios clínicos avaliando a eficácia de diferentes tratamentos é o IPSS (International Prognostic Scoring System). (4) Essa ferramenta foi validada em diferentes coortes de pacientes e avalia o efeito prognóstico conjunto das seguintes variáveis: porcentagem de blastos na medula óssea, tipos das alterações citogenéticas encontradas e número de citopenias, como pormenorizado na Tabela 1.

International Prognostic Scoring System (IPSS)					
Variável	Pontuação				
	0	0,5	1	1,5	2
% blastos MO ^a	<5	5 a 10	-	11 a 20	21-30
Citogenética ^b	Bom	Intermediário	Ruim	-	-
Citopenias ^c	0/1	2/3	-	-	-

Risco de transformação e sobrevida			
Risco	Pontuação total	Progressão	Sobrevida
		p/ LMA sem tratamento (anos)	mediana sem tratamento (anos)
Baixo	0	9,4	5,7
Int-1	0,5-1	3,3	35
Int-2	1,5-2	1,1	1,2
Alto	≥2	0,2	0,4

Tabela 1. IPSS: International Prognostic Scoring System, sistema prognóstico utilizado no estadiamento de pacientes diagnosticados com síndromes mielodisplásicas.

^a Sistema prognóstico desenvolvido antes da classificação da Organização Mundial de Saúde, que diminuiu o limiar de porcentagem de blastos para ≥ 20% para diagnóstico de LMA

^b Bom: normal, -Y, del(5q) isolada, del(20q); ruim: complexo (≥ 3 anormalidades) ou alterações no cromossomo 7; intermediário: outras alterações.

^c Neutrófilos < 1500/mm³, plaquetas < 100000/mm³, hemoglobina <10 g/dL.

LMA: leucemia mieloide aguda; Int: intermediário.

Fonte: Greenber *et al.*, 1997. (5)

Além das complicações decorrentes das citopenias, esse grupo de doenças carrega um risco acentuado de transformação para leucemia mieloide aguda, principalmente nos pacientes classificados como de maior risco (Tabela 1), e por isso essas doenças serem ditas como lesões “pré-leucêmicas”. (6)

No caso específico das leucemias mieloides agudas (LMA), estas caracterizam-se pelo acúmulo na medula óssea ou no sangue periférico de mais de 20% de blastos dentre as células nucleadas, tendo sido ou não precedido por quadro de mielodisplasia. A doença leva a maioria dos pacientes a óbito por sangramentos ou infecções caso o tratamento não seja instituído rapidamente. [Digite aqui]

(7) É o tipo mais comum de leucemias agudas no adulto, com dados recentes demonstrando incidência ajustada à idade de 4,3 casos por 100.000 anualmente nos EUA. (8) A doença pode se manifestar em qualquer faixa etária, mas há um predomínio em faixas etárias mais avançadas, com mediana de idade ao diagnóstico de 68 anos. (9)

Apesar do processo de leucemogênese ainda não ter sido completamente elucidado, acredita-se que a LMA tem origem da transformação oncogênica da célula tronco hematopoiética normal ou de progenitores que recuperam as propriedades de auto renovação das células tronco, e que, portanto, são capazes de manter o clone maligno viável de forma permanente. A possibilidade de quiescência e o acúmulo progressivo de novas lesões genéticas leva frequentemente à coexistência de diversos clones malignos no mesmo paciente, contribuindo para as altas taxas de resistência à quimioterapia e recidiva que são características da doença. (10)

Apesar de geralmente restrito, o desfecho dos pacientes e sua resposta à terapia tende a ser heterogêneo dependendo de fatores dependentes do paciente e da própria doença. A primeira classificação empregada para esse grupo de doenças, o sistema Franco-Americano-Britânico (FAB), estabelecido em 1976, separou 8 subtipos (de M0 a M7) de acordo com características morfológicas e citoquímicas dos blastos leucêmicos, e continua sendo utilizada em grande parte dos centros por sua facilidade de caracterização. Com o progresso das ferramentas diagnósticas, do entendimento da biologia dessas doenças e também com o surgimento de novas opções terapêuticas, em 2001 a Organização Mundial de Saúde introduziu uma nova classificação incorporando novos dados de genômica e imunofenotipagem, tendo sua última revisão sido elaborada em 2016. (11) Ambas as classificações podem ser observadas em maiores detalhes na Tabela 2.

OMS	FAB
<i>LMA com anormalidades genéticas recorrentes</i>	
LMA com t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1	
LMA com inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11	
Leucemia promielocítica aguda com PML-RARA	M3
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A	
LMA com t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214	
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM	
LMA megacarioblástica com t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1	
Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1	
LMA com NPM1 mutado	
LMA com mutações de CEBPA	
Entidade provisória: LMA com RUNX1 mutado	
<i>LMA com alterações mielodisplásicas</i>	
<i>Neoplasias mieloides relacionadas a terapia</i>	
<i>LMA não especificada</i>	
LMA com diferenciação mínima	M0
LMA sem maturação	M1
LMA com maturação	M2
LMA mielomonocítica	M4
LMA monoblástica/monocítica	M5
Leucemia eritróide aguda	M6
Leucemia megacariocítica aguda	M7
Leucemia basofílica aguda	
Panmielose aguda com mielofibrose	
<i>Sarcoma Mieloide</i>	
<i>Proliferações mieloides associadas a Síndrome de Down</i>	
Mielopoiese anormal transitória	
LMA associada a Síndrome de Down	

Tabela 2. Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) das leucemias mieloides agudas e correspondências com a classificação Franco-Americana-Britânica (FAB).

Fonte: (11)

Além dessas classificações, têm sido refinados também os esquemas prognósticos para LMA, que ajudam o hematologista clínico na escolha entre tratamentos padrão ou tratamentos de maior intensidade, que incluiriam a consolidação com transplante ou mesmo novas terapias em investigação. Atualmente, é possível separar os pacientes em categorias de risco baseadas em perfis citogenéticos e moleculares e que se associam a sobrevida e resposta [Digite aqui]

a terapia, e têm sido testados como possíveis preditores de recidiva no seguimento desses pacientes. (12) Essa categorização de risco pode ser evidenciada com mais detalhes na Tabela 3.

Grupo genético	Subtipos
Favorável	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> com baixa carga alélica <i>CEBPA</i> mutado
Intermediário	<i>NPM1</i> mutado e <i>FLT3-ITD</i> com alta carga alélica Wild-type <i>NPM1</i> sem <i>FLT3-ITD</i> ou com <i>FLT3-ITD</i> com baixa carga alélica (sem alterações citogenéticas de risco adverso) t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A</i> com rearranjo t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVI1)</i> -5 ou del(5q) -7 -17 ou Anormalidades (17p) Cariótipo complexo Wild-type <i>NPM1</i> E <i>FLT3-ITD</i> com alta carga alélica <i>RUNX1</i> mutado <i>ASXL1</i> mutado <i>TP53</i> mutado

Tabela 3. Correlações de dados moleculares e citogenéticos com desfechos clínicos em Leucemia Mieloide Aguda.

Abreviaturas: ITD, internal tandem duplication.

Cariótipo complexo é definido por 3 ou mais anormalidades cromossômicas na ausência de: t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(15;17), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) or t(3;3).

Fonte: (12)

Um importante marco no tratamento da LMA foi a implementação, durante a década de 1970, de esquemas quimioterápicos baseados na associação de citarabina com antraciclínicos, que melhoraram significativamente a

[Digite aqui]

probabilidade de se atingir a remissão completa da doença. (13) Apesar desse incremento nas taxas de remissão da doença, o resultado a longo prazo dos adultos com LMA continua precário, com uma sobrevida global em cinco anos girando em torno de apenas 25%, sendo menor que 10% para pacientes com mais de 65 anos, o grupo predominante de indivíduos afetados pela doença. (14) A principal razão para esse prognóstico restrito é o fato de que a maioria dos pacientes apresentará recidiva da doença mesmo após atingir remissão completa com o esquema quimioterápico inicial. Isso decorre provavelmente da permanência de um pequeno reservatório de células leucêmicas que persistem após a quimioterapia, uma condição conhecida como doença residual mínima (DRM), que pode evoluir para uma recidiva clínica completa. (15)

Portanto, apesar do avanço no conhecimento da fisiopatologia dessas doenças, este não foi acompanhado na mesma proporção por novos incrementos terapêuticos capazes de levar à cura ou mesmo prolongamento adequado da sobrevida, e o tratamento para a maioria dos pacientes pouco evoluiu nas últimas cinco décadas. Mesmo que novos compostos estejam sendo aprovados pelas agências reguladoras de diversos países em passo relativamente rápido e com benefícios em relação aos tratamentos convencionais, seu alto custo acaba por restringir o acesso a pacientes locados em países desenvolvidos ou em contexto de alguns poucos ensaios clínicos. (16)

A única opção terapêutica que pode ser considerada realmente curativa nessas doenças é a consolidação do esquema quimioterápico de indução de remissão com o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênicas. Entretanto, esse tratamento também apresenta importantes limitações. A primeira delas é a necessidade de um doador HLA-compatível, o que limita sua realização a uma parcela restrita dos pacientes. Além disso, o próprio procedimento apresenta altos índices de complicações e mortalidade, inviabilizando seu emprego em pacientes mais frágeis como, por exemplo, idosos ou portadores de comorbidades significativas. (17)

Mas foi através da prática do TCTH que se observou pela primeira vez o potencial do sistema imune como potente efetor antitumoral. Uma complicação frequente dos transplantes alogênicos é o desenvolvimento da doença do

enxerto contra o hospedeiro (DECH): a reação dos linfócitos T alo reativos do doador contra os tecidos do receptor, podendo resultar em manifestações cutâneas, oculares, gastrointestinais, pulmonares, entre outras. (18) Entretanto, observou-se que os pacientes acometidos pela DECH também apresentavam menores chances de recorrência da doença, assim como o fato de que enxertos depletados de células T levavam a menor ocorrência de DECH mas também levavam a aumento nas taxas de recidiva. (19,20) Estudos posteriores demonstraram a razão para esse benefício: os linfócitos do doador eram capazes também de eliminar células leucêmicas residuais do receptor. (21)

A primeira evidência da ocorrência desse fenômeno apareceu na década de 1950, em modelo de transplante animal, onde demonstrou-se a eliminação de células leucêmicas após infusão da medula óssea do doador quando havia adiamento do esquema de imunossupressão, e apontando para a possibilidade de que as células viáveis do doador fossem responsáveis pela erradicação das células neoplásicas. (22) Uma década depois, ficou demonstrado também em humanos que a doença era eliminada pelo efeito do “enxerto contra leucemia” (GvL – graft versus leukemia) e usou-se pela primeira vez o termo GvHD (graft versus host disease; doença do enxerto contra hospedeiro) para descrever a síndrome clínica que se manifestava secundariamente aos transplantes alogênicos. (23)

Nesse contexto, as evidências do papel dos linfócitos no efeito anti-leucemia têm fomentado a busca por terapêuticas baseadas no sistema imune como uma nova possibilidade no arsenal terapêutico dessas doenças. Quando se considera a alta morbidade e mortalidade associadas tanto aos esquemas quimioterápicos quanto ao transplante, e mesmo assim com altas taxas de recidiva, fica ainda mais clara a necessidade de desenvolvimento de novas opções terapêuticas menos tóxicas e mais efetivas.

Considerando esse cenário, grande expectativa tem sido lançada sobre novas terapias em desenvolvimento como tratamento de resgate nos casos refratários ou com doença residual persistente após tratamento convencional. Essas incluem, por exemplo, o uso das células CAR-T (*Chimeric antigen receptor T cells*, ou células T com receptores de antígenos quiméricos). Essas

preparações baseiam-se em linfócitos com receptores quiméricos produzidos por edição gênica, com capacidade de ligação a alvos específicos na superfície das células tumorais e efetivação de ataque citotóxico. (24)

Apesar de resultados promissores com o uso dessa estratégia nas leucemias linfoides agudas e nos linfomas de células B (25,26), ainda não há um produto disponível e licenciado para uso que apresente especificidade para leucemia mieloide aguda. Além disso, deve-se considerar o ainda altíssimo custo de produção dessas preparações, e a ocorrência de eventos adversos graves, como a síndrome de liberação de citocinas, uma complicação potencialmente fatal e que demanda no seu manejo ambiente de terapia intensivo e a disponibilidade de anticorpos anti-IL-6 para o seu tratamento, também com uso restrito por seu custo e baixa disponibilidade.

Portanto, no contexto do sistema público de saúde brasileiro, é necessária também a busca por alternativas que, além de eficácia terapêutica na prevenção de recidiva, tenham também o potencial de fabricação *in house* e com perfil toxicológico passível de ser manejado na estrutura disponível, tornando-se factível a essa realidade.

Potencial do uso de vacinas de células dendríticas no tratamento das neoplasias mieloides

A experiência crescente com o uso do TCTH e a observação mais detalhada do efeito do “enxerto contra leucemia” demonstrou a atuação dos linfócitos T CD8+ e das células Natural Killer (NK) como os principais responsáveis por esse ataque citotóxico. Nesse contexto, as células dendríticas (DCs) aparecem como importantes orquestradoras dessa resposta imunológica, por serem dotadas da habilidade única de estimular e potencializar o efeito anti-leucêmico de ambos os tipos de células imunes efetoras (linfócitos T e células NK), e por isso têm despertado grande interesse como possível nova terapia de prevenção de recidiva na doença. (27)

De fato, a descoberta das células dendríticas em 1972 (28) foi considerada um grande marco no entendimento do funcionamento do sistema imune e, posteriormente, da imunologia dos tumores, revelando suas
[Digite aqui]

capacidades especializadas de captura, processamento e apresentação de antígenos, que podem ser observadas na Figura 1. Apresentam ampla distribuição tecidual, atuando como um sistema de vigilância que interliga os sistemas imunes inato e adaptativo. São geradas através de precursores na medula óssea e classificadas de forma simplificada em quatro grupos gerais: DCs convencionais (cDC), DCs plasmocitóides (pDC), DCs derivadas de monócitos, e células de Langerhans. As cDC são posteriormente classificadas de acordo com sua localização tecidual, marcadores de superfície e mais recentemente também através da expressão de fatores de transcrição específicos. (29)

A função elementar das DCs é instruir e ativar células T naïve para uma resposta imune adaptativa. Em sua forma imatura, apresentam ávida capacidade de captura de antígenos e baixa expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e de moléculas coestimulatórias (como CD80 e CD86). (30) Após reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou outros sinais antigênicos (que incluem a presença de células tumorais), as DCs passam por processo de maturação, com aumento da expressão de MHC e coestimuladores em sua superfície, além de produção de citocinas essenciais para a ativação dos linfócitos T. (31,32)

No caso da LMA, o início da resposta imune citotóxica mediada por células T também se inicia pela apresentação de antígenos relacionados à doença pelas células dendríticas para os linfócitos T CD8+ citotóxicos e CD4+ auxiliares, através de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classes I e II, respectivamente. Após estimulação, as células T CD4 + naïve podem ser polarizadas em células T auxiliares tipo 1 (T_H1), que por sua vez, suportam a geração e proliferação de linfócitos T CD8+ citotóxicos antígeno-específicos. Esses linfócitos (através do seu receptor específico de células T) são capazes de reconhecer células leucêmicas que exibam os antígenos específicos para os quais haviam sido estimulados. Segue-se então o ataque citotóxico, para os quais esses linfócitos possuem diferentes possibilidades de efetivação, como ligantes de receptores associados à morte celular (como FasL) ou proteínas citolíticas liberadas de grânulos intracitoplasmáticos (como granzima B e perforina). (33,34) Além disso, diversas citocinas produzidas pelas DCs estão [Digite aqui]

envolvidas na ativação de células NK (como IL-12). Essas células NK podem neutralizar células leucêmicas utilizando as mesmas ferramentas citolíticas que os linfócitos T efetores, mas de forma inespecífica e independente de MHC, além de exercerem efeito imunomodulatório através da secreção de citocinas como IFN- γ , dando suporte às respostas dependentes de linfócitos. (35)

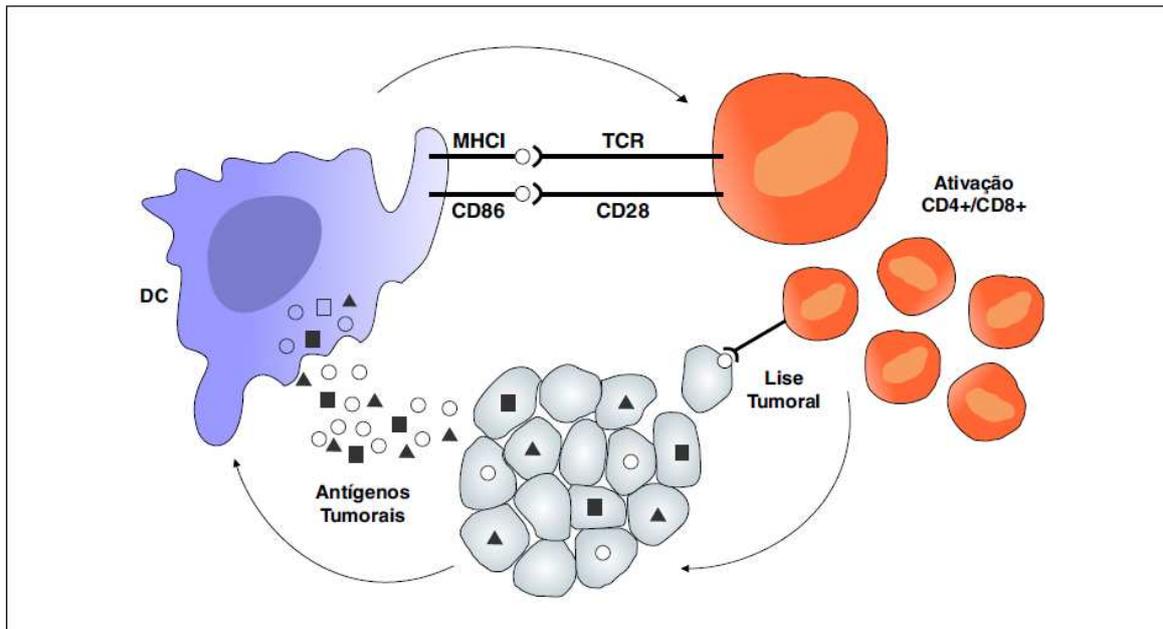


Fig. 1 - Ciclo da imunidade anti-tumoral. Antígenos liberados pelas células neoplásicas são internalizados pelas células dendríticas, processados e apresentados a linfócitos T através de proteínas codificadas pelo MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e moléculas co-estimulatórias (CD86). O resultado desse processo é a proliferação e ativação de linfócitos citotóxicos e de memória, culminando em lise tumoral.

Entretanto, clones tumorais podem desenvolver habilidades de escapar a esse sistema de defesa, proliferando-se livremente e levando a uma nova doença manifesta ou à sua recidiva. Evasão tumoral pode ocorrer por diversos mecanismos, como diminuição do reconhecimento imune através da produção pelas células tumorais de antígenos com menor imunogenicidade, redução da expressão de moléculas MHC acarretando menor capacidade de apresentação

[Digite aqui]

de antígenos e falha na ativação de células citotóxicas efectoras, além de desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor através da liberação de citocinas e proliferação de linfócitos T reguladores (Tregs). (36) Justamente por sua inerente plasticidade, DCs podem tornar-se propensas aos efeitos do microambiente tumoral imunossupressor: células tumorais podem suprimir as funções das DCs polarizando-as a um fenótipo imunotolerante ou através do recrutamento de precursores de DCs com capacidades imunossupressoras. Diversos mecanismos têm sido descritos para explicar essas alterações, incluindo efeito de diversas citocinas, como IL-6 e IL-10, fatores de crescimento, alterações metabólicas e oxidativas. (37,38)

Apesar dessas alterações quantitativas e qualitativas de DCs encontradas em pacientes com câncer, ficou demonstrada a possibilidade de se gerar e diferenciar células dendríticas maduras a partir de leucócitos mononucleares do sangue periférico dos próprios pacientes através de meios de cultura específicos e suplementados de citocinas pró-inflamatórias. (39) O desenvolvimento e aprimoramento dessas técnicas de cultura celular permitiram crescentes rendimentos em número de células ao longo da década de 90, o que permitiu a exploração do pulso das DCs com antígenos tumorais como uma nova possibilidade de vacinas contra o câncer. (40,41) Os protocolos convencionais mais utilizados empregam monócitos separados de sangue periférico que são diferenciados *ex vivo* em células dendríticas maduras (42,43), que são então pulsadas com antígenos tumorais específicos sob variadas formas, como peptídeos sintéticos (44), ácido nucleico tumoral (45), corpos apoptóticos (46), entre outros.

O primeiro estudo que testou vacinas com células dendríticas em pacientes com câncer foi publicado em 1996 e avaliou o uso de células dendríticas pulsadas com peptídeo tumoral em quatro pacientes com diagnóstico de linfoma de células B folicular. Todos os pacientes desenvolveram resposta celular antitumoral detectável; sendo que dois dos pacientes apresentaram regressão completa do tumor após o esquema de vacinação. (47) Desde então, resultados de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* têm demonstrado conclusivamente a segurança dessas vacinas e sua eficácia no desenvolvimento

de resposta imune específica contra vários tipos de tumores (48,49), incluindo as neoplasias hematológicas. (50,51)

Uma das formas possíveis de imunoterapia com células dendríticas consiste na utilização de RNA mensageiro eletroporado nas DCs. O gene escolhido para utilização deve corresponder a um antígeno que apresente características importantes para esse papel, como alta expressão na célula tumoral, imunogenicidade satisfatória e especificidade. Nenhum antígeno estudado até o momento apresenta todas as características necessárias para ser considerado o ideal para pulso antigênico; entretanto WT1 (Wilms' Tumor 1) parece agregar diversas dessas características de forma satisfatória, principalmente no caso das LMA. (52) A proteína WT1 é altamente expressa na maioria dos pacientes com LMA, sendo considerado um importante fator prognóstico e um marcador de doença residual mínima após tratamento. (53) Ficou demonstrado também seu papel no fenótipo maligno da LMA: estudo em animais demonstrou que a injeção de células CD8+ com seletividade para WT1 levou a eliminação de blastos leucêmicos preservando as células normais. (54) O produto do gene WT1 é um fator de transcrição, inversamente expresso de acordo com o grau de maturação na hematopoiese normal, sendo detectado em células progenitoras hematopoiéticas CD34+ e não em leucócitos normais de sangue periférico. (55) Há evidência satisfatória de sua função na leucemogênese e estudos pré-clínicos e clínicos iniciais demonstram que a resposta imune contra o WT1 é importante para a rejeição do tumor. (45) De fato, nossos resultados também mostraram que blastos dos pacientes atendidos em nosso centro também apresentavam alta expressão de WT1. (56)

Diante desses achados, estudo de fase I / II publicado em 2010 que investigou o efeito da vacinação com células dendríticas autólogas eletroporadas com WT1 em 10 pacientes com LMA mostrou sua segurança e eficácia: dois pacientes em remissão parcial após a quimioterapia alcançaram remissão completa após a administração das vacinas. Nestes dois pacientes e em três outros pacientes que estavam em remissão completa, os níveis de WT1 retornaram ao normal após a vacinação, compatível com a indução de remissão molecular. Além disso, as respostas clínicas foram correlacionadas com aumento de células T CD8+ específicas para WT1, comprovando um importante

[Digite aqui]

papel desse tipo de imunoterapia na prevenção de recidiva em pacientes com LMA. (45)

Estudo subsequente publicado em 2017 envolvendo 30 pacientes com LMA em alto risco de recaída demonstrou que as vacinas com DCs eletroporadas com WT1 foram capazes de prevenir ou postergar recaída em 43% dos pacientes. Nove pacientes obtiveram remissão molecular como demonstrado pela normalização dos níveis de transcritos de WT1, 5 dos quais foram mantidos após um acompanhamento médio de 109,4 meses. Houve aumento da sobrevida global tanto em pacientes abaixo quanto acima dos 65 anos, quando comparados com séries históricas (sobrevida global em 5 anos em pacientes abaixo ou acima dos 65 anos: 69,2% e 30,8%, respectivamente, comparados a 51,7% e 18% quando tratados de forma convencional). (57)

Desde 2015 estão sendo também produzidas em nosso laboratório vacinas de células dendríticas autólogas eletroporadas com RNAm de WT1, que foi gentilmente cedido pela Profa. Evelien Smits, do Departamento de Imunologia Tumoral da Universidade de Antuérpia, na Bélgica. Esse ensaio clínico (identificador no portal *clinicaltrials.org*: NCT03083054) para avaliação das vacinas como possibilidade de tratamento de manutenção para prevenção de recidiva incluiu até o momento 5 pacientes com diagnóstico de LMA, em remissão completa após quimioterapia de indução e consolidação com citarabina em altas doses ou transplante autólogo. Após o fim do tratamento convencional, os pacientes foram submetidos a procedimento de leucoaférese, tendo seus leucócitos mononucleares separados por técnica de centrifugação em gradientes ou através do sistema automatizado CliniMacs®, em que é realizada a seleção positiva de monócitos CD14+ através do uso de beads magnéticas. Esse produto de separação celular é então colocado em cultura com meio específico para células dendríticas e fatores de diferenciação (GM-CSF e IL-4) e, no 6º dia de cultura, suplementado de fatores de maturação de células dendríticas (TNF- α e PGE2). No 8º dia de cultura, a maturação e viabilidade celular é observada através de imunofenotipagem com marcadores específicos (Anexina/PI, CD80, CD83, CD86 e HLA-DR) e as células são então eletroporadas com o RNAm de WT1. A comprovação da internalização do antígeno é feita por imunocitoquímica de esfregaços das células. Cada dose da vacina consiste em 5×10^7 células

[Digite aqui]

viáveis e são armazenadas a -80°C e descongeladas individualmente antes de cada aplicação. O esquema terapêutico consiste em 4 aplicações intradérmicas, na face ventral do braço, a aproximadamente 10 cm da região axilar (espera-se haver o desencadeamento da resposta imunológica nos linfonodos axilares) com intervalo de 15 dias entre as doses.

Nenhum dos 5 pacientes apresentou efeitos colaterais importantes; de fato, apenas 1 paciente queixou-se de prurido local no dia seguinte à aplicação da primeira dose. Todos encontram-se vivos em remissão completa da doença, sendo acompanhados pelos níveis de expressão de WT1 em sangue periférico avaliados por técnica de RT-PCR. Os dados clínicos dos pacientes incluídos nesse estudo e o tempo de seguimento de cada um deles está explicitado em detalhes na Tabela 4.

N	Sexo	Idade	FAB	Fatores Prognósticos	Terapia de indução de remissão	Sobrevida (meses)*
1	M	43	M4	47, XY, del (8)(q22), +22(04)/46, XY (16), NPM1 e FLT3 ITD: neg, FLT3 TKD +	Indução + 3 ARAC-HD	34
2	M	24	M4	46 XY, FLT3 e NPM1 neg	Indução + 1 ARAC-HD + TCTH auto	29
3	M	57	M4	46, XY, NPM1 positivo, FLT3 ITD e TKD neg	Indução + 3 ARAC-HD	28
4	M	41	M1	45,XY,t(8;21)(q22;q22),-Y[22], FLT3 e NPM1 neg	Indução + 3 ARAC-HD	27
5	F	32	M4	46, XX, inv(16)(p13q22)[22], NPM1 e FLT3D neg, FLT3 TKD+	Indução + 3 ARAC-HD	19

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes submetidos a terapia de manutenção com vacinas de células dendríticas eletroporadas com WT-1. ARAC-HD: citarabina em altas doses. *Da última dose de vacina até setembro/2019.

Apesar da relativa facilidade de preparação dessas vacinas e a efetividade do pulso com RNAm de WT1, essa técnica ainda apresenta importantes limitações. A primeira delas refere-se ao processo de eletroporação em si: a passagem de corrente elétrica através das células é importante para alteração de seu potencial de membrana permitindo a entrada do ácido ribonucleico; entretanto, esse fator físico é também responsável pela morte prematura de muitas células, fazendo com que seja necessária a produção de um número muito maior de células para se obter um produto com rendimento minimamente satisfatório após o choque elétrico. (58)

Um segundo ponto é a especificidade e restrição do antígeno. Trata-se de um único antígeno, restringindo seu uso apenas aos pacientes nos quais está realmente hiperexpresso nos blastos, e com o risco de perda dessa expressão como parte da evolução clonal das neoplasias. Portanto, a geração de vacinas de células dendríticas mais potentes e efetivas depende também da busca de novas fontes de pulso antigênico que sobrepujem essas dificuldades, de forma que seja o mais personalizado possível para cada paciente, mas ao mesmo tempo amplo o suficiente para evitar evasão tumoral e de preferência sem efeitos deletérios sobre as próprias DCs. Nesse contexto, uma das abordagens que parece agregar todas essas características seria o uso de exossomos do próprio paciente.

A busca por novas formas de pulso antigênico para imunoterapia: exossomos

Exossomos são pequenas vesículas medindo aproximadamente entre 30 a 150nm, secretadas por diferentes tipos celulares e que recentemente têm recebido grande atenção por seu possível papel como biomarcadores em diversas condições patológicas. (59) Apesar de anteriormente citados como meros restos celulares, estudos recentes têm demonstrado um papel ativo dos exossomos na comunicação intercelular através do transporte de proteínas, RNA e microRNAs que podem alterar de forma significativa a função de células alvo. (60,61) Sabe-se agora que os exossomos correspondem a vesículas intraluminais dos corpos multivesiculares endossomais (MVBs), formados após invaginação de

[Digite aqui]

endossomos e liberados no espaço extracelular por fusão dos MVBs com a membrana plasmática. Por essa origem celular, essas partículas contêm proteínas específicas marcadoras da via endossomal, como tetraspaninas (CD63, CD9 e CD81) e heat shock proteins (HSP70) 8. (62)

Os exossomos foram primeiramente visualizados em meio coletado de culturas de reticulócitos (63) e desde então, diversos tipos celulares foram identificados como fontes de exossomos, como células hematopoiéticas, células epiteliais, neurônios, adipócitos, entre outros. (64) Inicialmente foi sugerido para os exossomos um papel de remoção de moléculas desnecessárias ao metabolismo celular e que eram apenas parcialmente degradadas pelo sistema lisossomal. (65) Entretanto, com o progresso das investigações, suas funções parecem ser consideravelmente mais complexas: plaquetas secretam exossomos com capacidade de regulação da coagulação (66), as vesículas extracelulares de progenitores cardíacos são capazes de inibir apoptose de cardiomiócitos após infarto do miocárdio (67) e exossomos derivados de astrócitos diminuem o dano neuronal causado por hipóxia através da regulação de autofagia *in vivo*. (68) O que ficou claro com essas observações foi o fato de que, por serem portadores de perfis particulares de proteínas, RNA e microRNAs, mas que recapitulam o conteúdo interno de suas células de origem, essas nanopartículas parecem passar por um processo de “empacotamento seletivo”, como forma de refinar e potencializar a comunicação intercelular à distância e portanto regulando importantes funções biológicas. (69)

Dentre essas funções, estão descritas também propriedades dos exossomos como moduladores do sistema imune. Dependendo do seu conteúdo interno, essas nanopartículas podem potencializar a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (70) e exossomos derivados de macrófagos são capazes de transferir antígenos até as células dendríticas, e com isso aumentando a resposta de células T CD4+. (71)

As próprias DCs podem secretar exossomos com potencial de ativação de células T CD4+, CD8+ e NK de forma antígeno-específica. (72,73) Da mesma forma, as células do sistema imune podem ser afetadas por exossomos secretados por outras células, notadamente no caso dos tumores. Células

tumorais podem secretar exossomos com capacidade de atenuação das respostas de células T, B, macrófagos, células NK e DCs, além de promover proliferação de células mieloides supressoras (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), um grupo heterogêneo de células mieloides imaturas envolvidas em estados de imunossupressão. (74,75)

Entretanto, considerando a possibilidade de carregarem conteúdo específico das células tumorais das quais têm origem, especulamos que exossomos purificados do soro de pacientes poderiam consistir em uma fonte atrativa de antígenos específicos do tumor do próprio paciente, permitindo uma abordagem mais individualizada para imunoterapia. Esse material poderia, portanto, ser uma forma eficiente de pulso antigênico *in vitro*, carregando material específico do tumor do próprio paciente, mas fora do contexto imunossupressor do ambiente tumoral. De fato, no caso de um grupo de doenças com mecanismos fisiopatológicos tão diversos e complexos como as LMA e as SMD, seria interessante que as células dendríticas pudessem apresentar antígenos da maneira mais personalizada possível, atingindo o(s) clone(s) específico(s) de cada paciente.

De fato, até o momento da concepção deste trabalho, estudos em animais demonstravam que vacinação com DCs pulsadas com exossomos derivados de leucemia ou de células leucêmicas em cultura resultou em maior sobrevivência se comparado com vacinação com células dendríticas pulsadas com lisado tumoral ou apenas a infusão direta dos exossomos. (76,77)

Portanto, nossa hipótese era que essas nanopartículas poderiam conter um “pool” de elementos antigênicos que incitariam uma resposta imune mais ampla e ao mesmo tempo específica quando usadas como pulso para células dendríticas. Essa especificidade seria relacionada tanto à doença quanto ao próprio paciente (ao contrário do uso mais genérico e isolado do RNAm de WT1), além dos benefícios de sua mais fácil obtenção (através de amostras de sangue periférico) e maior facilidade de manipulação e internalização das DCs (através de coculturas e sem necessidade de eletroporação).

Exossomos: métodos de purificação e análise de microRNAs no contexto de biópsia líquida e medicina personalizada

Com as técnicas atualmente disponíveis, é possível estudar, de forma relativamente simples, exossomos derivados dos mais diferentes fluidos corporais, incluindo sangue, urina, efusões pleurais ou líquido ascítico, além de células em cultura.

Inicialmente, entretanto, os métodos empregados na separação e purificação dessas nanopartículas em materiais biológicos baseavam-se no uso de técnicas de ultracentrifugação. Para obtenção de pureza satisfatória com esses métodos, são necessários diversos ciclos de centrifugações com altíssimas rotações (da ordem de 100.000g) por extensos períodos (cada ciclo durando de 45 a 60 minutos, podendo totalizar até 6 horas para cada ciclo de amostras, dependendo do protocolo) e com necessidade do uso acessório de filtros ou gradientes de sucrose. (78) Alguns pontos negativos no emprego dessa metodologia são a necessidade da disponibilidade dessas ultracentrífugas no laboratório e bastante tempo para cada ciclo de purificação.

Para trespassar esses obstáculos, mais recentemente foram desenvolvidos métodos baseados em polímeros, que facilitam bastante esse processo de extração. Essas substâncias são capazes de formar uma “bolsa” de polímeros ao redor dos exossomos precipitados, resultando num material concentrado, após um procedimento que dura menos de 2 horas e requer apenas 3 centrifugações com baixas rotações. Essas técnicas já foram validadas em comparação com as técnicas de ultracentrifugação convencionais, revelando que o rendimento, tanto em número de partículas quanto em recuperação de proteínas, é tão bom ou melhor do que a ultracentrifugação, mas com menos tempo de bancada e também com nível de pureza adequado, visualizado tanto através do tamanho das partículas isoladas quanto da expressão de marcadores específicos de exossomos. (79)

Após sua purificação, um outro ponto de atenção é a caracterização estrutural das nanopartículas nas amostras isoladas e a comprovação de sua pureza. As informações de tamanho e concentração das nanopartículas nas amostras podem ser úteis também na comparação entre estados fisiológicos e

[Digite aqui]

patológicos na busca de possíveis biomarcadores em situações diversas. (80) E esses objetivos podem ser atingidos de diversas maneiras.

O primeiro método de visualização de vesículas extracelulares foi a microscopia eletrônica de transmissão, permitindo a observação de partículas na escala de nanômetros. Entretanto, sua eficácia na definição do número de partículas pode ser afetada pelos processos de fixação da amostra, e que podem também afetar a mensuração de seu tamanho no caso de desidratação das vesículas ao longo do processo. (81,82) Geralmente, nesse caso, é necessária associação com técnicas capazes de demonstração de proteínas específicas dos exossomos para sua caracterização mais precisa, como CD9 e CD63, e que pode ser realizada através de técnicas como Western Blot ou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).(83)

É possível também medir o tamanho e distribuição de vesículas extracelulares através de citometria de fluxo. Sua principal limitação, no entanto, é o tamanho de partículas que podem ser detectadas em citômetros convencionais, geralmente acima de 200nm, o que pode ser melhorado com o uso de citômetros de nova geração. (84) A maior vantagem desse método, na disponibilidade desses equipamentos, seria a possibilidade de quantificação de múltiplos marcadores na mesma amostra, permitindo a marcação com as proteínas específicas de exossomos e também com as de tipos celulares específicos, possibilitando, em algumas situações, o rastreamento da origem celular das vesículas.

Outro método mais recentemente descrito e validado para observação da dispersão de pequenas partículas em amostras líquidas é o NTA: Nanoparticle Tracking Analysis. Nesse método, um feixe de laser passa sobre a amostra que está em uma cubeta dentro do equipamento, e uma câmera captura o movimento Browniano dessas partículas diluídas em meio líquido. O aparelho utiliza a equação de Stokes-Einstein para calcular os marcadores hidrodinâmicos de cada partícula, resultando em medidas de concentração e tamanho das partículas em cada amostra. Esse método é capaz de mensurar partículas tão pequenas quanto 20nm, e ainda apresenta outras vantagens em relação às abordagens descritas anteriormente: facilidade na preparação das amostras,

sem necessidade de marcação com anticorpos e requerendo baixos volumes a cada mensuração, além de rápida análise e liberação dos resultados. (85)

Além da caracterização estrutural dos exossomos e sua concentração nas amostras, um outro ponto de interesse crescente é a avaliação de seu conteúdo particular de proteínas e ácidos nucleicos, particularmente microRNAs. Esse novo campo de estudo traz a possibilidade de seu uso como biomarcadores diagnósticos ou prognósticos de forma mais simples e menos invasiva, caracterizando o conceito de biópsia líquida.

Os microRNAs são pequenas sequências de RNA não codificadoras (aproximadamente 20 a 24 nucleotídeos) que atuam através da modulação da expressão de outros RNAm já transcritos, ou seja, têm importante função na regulação da expressão gênica pós-transcricional. (86) Essas pequenas sequências são geradas a partir de um transcrito primário no núcleo, que passa por processamento enzimático e clivagens sucessivas até sua forma final. Esse microRNA maduro é acoplado ao complexo silenciador induzido por RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), que tem como alvo a região 3' não traduzida de RNAm específicos de acordo com sequências complementares. O resultado final é uma redução na produção de proteínas através de mecanismos que envolvem diminuição da estabilidade do RNAm alvo e redução nas taxas de tradução. (87,88)

A descoberta da função de diversos microRNAs tem contribuído para o entendimento do seu papel em múltiplas funções biológicas e também na fisiopatologia de diversas doenças. Esses estudos revelaram o potencial de monitorar a expressão de microRNAs como marcadores dessas mesmas funções biológicas ou do risco da ocorrência de determinadas situações patológicas. Isso mostrou-se particularmente factível observando-se o conteúdo de microRNAs concentrados nos exossomos, e demonstrando seu possível uso como biomarcadores não só em doenças neoplásicas, mas também em outros processos, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Como exemplos, observou-se que o conteúdo de microRNA exossomal no soro de pacientes, tanto com câncer colorretal (89) quanto pulmonar (90), poderia ser um

marcador de recorrência da doença; foi demonstrado também seu potencial preditivo em doença de Alzheimer e Parkinson. (91,92)

Nos últimos anos também vêm sendo revelados os papéis de vários microRNAs especificamente sobre a função da célula tronco hematopoiética normal, incluindo suas capacidades de proliferação, autorrenovação e diferenciação. (93) Notadamente nas neoplasias hematológicas, têm sido descritos também os mecanismos pelos quais as células neoplásicas são capazes de desregular a produção de microRNAs específicos com a finalidade de potencializar suas funções de invasão, proliferação e inibição da apoptose. Essas modificações incluem, entre outras, deleções, amplificação no número de cópias e alterações epigenéticas. (87) Por essas características, e pela possibilidade do uso de microRNAs exossomais como preditores de transformação maligna, resposta à quimioterapia ou recidiva pós tratamento, o estudo dessa abordagem diagnóstica e prognóstica tem gerado interesse crescente no contexto da biopsia líquida e da medicina personalizada.

Dentre os microRNAs envolvidos na biologia da célula tronco hematopoiética, alguns já estão sendo evidenciados como importantes elementos também na fisiopatologia das neoplasias hematológicas, e por isso poderiam ser alvos interessantes na busca de biomarcadores exossomais. Especial interesse tem recaído sobre mir-223, desde que estudos iniciais mostraram sua especificidade para os tecidos hematopoiéticos, observada através de sua expressão quase que exclusiva em medula óssea e baço. (94) Além disso, parecia haver também uma predileção por alguns subtipos celulares específicos, notadamente a linhagem granulocítica e macrófágica. Estudos funcionais demonstraram inclusive que a perda da expressão de mir-223 levava à segmentação anômala de neutrófilos, resultando em hiperativação, inflamação pulmonar e maior destruição tecidual quando animais eram expostos a endotoxina, evidenciando um possível papel de mir-223 na diferenciação granulocítica e na regulação da resposta dos neutrófilos a infecção. (95)

Além dessa possível atuação na diferenciação hematopoiética, ficou demonstrado também o tráfego de mir-223 através de microvesículas celulares. Essas partículas enriquecidas de mir-223, quando liberadas de macrófagos,

foram capazes de atingir diversas células-alvo de forma funcionalmente ativa, como monócitos e fibroblastos, e induzindo sua diferenciação em macrófagos. (96)

No caso específico das neoplasias hematológicas, o papel de mir-223 no fenótipo tumoral e sua atuação através de microvesículas ainda não foi completamente elucidado. Sua supressão em LMA foi associada a perfil citogenético desfavorável e falhas de diferenciação. Pacientes com LMA portadores da translocação (8;21) apresentaram baixos níveis de mir-223, e ficou demonstrado que esse microRNA era um alvo direto da proteína de fusão AML1/ETO que é gerada por essa translocação. Interessantemente, a indução de expressão de mir-223, tanto através de mimetizadores desse microRNA quanto por tratamento com drogas hipometilantes, levou a uma restauração da diferenciação celular na doença, evidenciando a ligação entre uma mutação específica das LMA e o silenciamento epigenético de mir-223, resultando em bloqueio de diferenciação granulocítica. (97)

Em pacientes com Leucemia Linfóide Crônica, a baixa expressão desse microRNA também se mostrou associado a piores desfechos clínicos, incluindo menor sobrevida, (98) e teve valor prognóstico comparável a outros marcadores já bem reconhecidos para essa doença, como ZAP70 e CD38. (99)

Mas mesmo no caso das neoplasias hematológicas os resultados são conflitantes. Estudo avaliando pacientes acometidos por leucemia linfoblástica de células T identificou um subgrupo de pacientes com maior expressão de mir-223 que apresentavam características mais específicas de neoplasia mieloide e, surpreendentemente neste caso, o aumento da expressão de mir-223 conferia um prognóstico mais desfavorável (100), apontando para a possibilidade de que a atuação de mir-223 tenha especificidade para determinadas doenças ou contextos.

O mesmo acontece para outro microRNA que parece ter importante atuação no sistema hematopoiético, o mir-22. Esse microRNA mostrou-se inclusive suprarregulado em LMA e SMD, e seu silenciamento levou a bloqueio da proliferação das células leucêmicas, evidenciando um possível papel como oncogene. (101) Mas, surpreendentemente, estudo posterior revelou uma

[Digite aqui]

possível função de mir-22 como supressor tumoral em diversos tipos celulares, e demonstrou menor expressão de mir-22 em pacientes com LMA, contrariamente ao que havia sido descrito previamente. Os autores demonstraram também que a indução de expressão de mir-22 suprimia significativamente a viabilidade das células leucêmicas *in vitro* e o desenvolvimento de leucemia *in vivo*. Além do mais, esse mesmo trabalho demonstrou que a entrega de mir-22 através de nanopartículas contribui para o efeito supressor sobre as células leucêmicas. (102)

Esses resultados contraditórios também foram observados em outras neoplasias: mir-22 apresentou atividade inibitória sobre a proliferação celular e induziu apoptose em tumores sólidos como câncer de pulmão e mama, (103,104) mas também atua na progressão de Leucemia Linfóide Crônica através de ativação da via de PI3K/AKT. (105) Portanto, parece exibir atividade tanto como oncogene quanto supressor tumoral, a depender do contexto.

Diante desses resultados ainda conflitantes, outro interesse deste estudo foi caracterizar o perfil dos exossomos presentes especificamente no soro de pacientes diagnosticados com SMD e LMA, com especial interesse em seu conteúdo interno de microRNAs sabidamente envolvidos na hematopoiese normal e que poderiam, futuramente, ser validados como biomarcadores em situações patológicas.

OBJETIVOS

Considerando a necessidade de aprimoramento nos modelos de imunoterapia celular atualmente disponíveis e a emergência dos exossomos como importantes elementos na comunicação intercelular, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade do uso dessas nanopartículas como pulso antigênico para células dendríticas. Além disso, pretendeu-se também avaliar a possibilidade do uso dessas nanopartículas e seu conteúdo interno de microRNAs como biomarcadores nas neoplasias hematológicas.

Objetivos específicos

1. Avaliar a estrutura e função dos exossomos, quanto a:

[Digite aqui]

- a) concentração e distribuição de tamanho nas amostras,
- b) estabelecimento de uma plataforma para estudo da expressão de microRNAs em exossomos purificados de sangue periférico e sua utilização como possíveis marcadores prognósticos,
- c) avaliação da expressão de mir-223 e mir-22 nas amostras de exossomos isolados de soro humano;
- d) comparação das características estruturais e expressão de microRNAs entre os diversos grupos de pacientes e controles saudáveis.

2. Avaliar o potencial dos exossomos como fonte antigênica para novas formas de imunoterapia, especificamente:

- a) capacidade de maturar e diferenciar células dendríticas em um fenótipo citotóxico contra células tumorais;
- b) capacidade dessas DCs em estimulação de linfocitotoxicidade;
- c) comparação da magnitude desses efeitos em relação a DCs não pulsadas ou a DCs estimuladas com outras fontes antigênicas alternativas, como lisados tumorais.

METODOLOGIA

Desenho do estudo

Este foi um estudo prospectivo em que exossomos foram extraídos de amostras de sangue periférico de controles normais ou pacientes com diagnóstico de LMA, SMD e LMC e avaliados quanto a seu tamanho e concentração em cada uma das amostras. Paralelamente, amostras selecionadas foram usadas para testar o potencial dessas nanopartículas como ativadoras da função citotóxica dependente de DCs contra células-alvo leucêmicas. Paralelamente, foi avaliada a expressão de microRNAs específicos como parte do conteúdo interno dos exossomos, assim como sua possível relação com parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos e seu papel na diferenciação da célula tronco hematopoiética normal.

[Digite aqui]

Casuística e coleta de amostras

Amostras de sangue venoso (8ml) foram coletadas por punção periférica, de 42 pacientes recém diagnosticados com SMD ou LMA, antes de instituição de qualquer tratamento, 1 paciente com Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e de 19 voluntários saudáveis. O sangue foi coletado em tubos à vácuo, heparinizados, e as amostras processadas em alíquotas de soro, após centrifugação, e armazenadas a -80°C. Todos os indivíduos participantes foram orientados acerca dos procedimentos e objetivos deste estudo, tendo assinado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética desta instituição (parecer nº 1.242.880, consultar Anexo). Foram excluídos dessa seleção indivíduos considerados vulneráveis (menores de idade, pessoas institucionalizadas, pacientes com antecedentes de doenças psiquiátricas com comprometimento cognitivo ou incapacidade) e pacientes que tivessem recebido transfusões de hemocomponentes nos 120 dias anteriores à coleta. Os pacientes foram classificados de acordo com os critérios FAB, OMS e escore prognóstico IPSS descritos anteriormente.

Isolamento e caracterização estrutural dos exossomos nas amostras

As amostras foram processadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min para separação do soro. Os exossomos foram isolados de 500µL de soro utilizando-se ExoQuick® Exosome Precipitation Solution (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) de acordo com orientações do fabricante. O precipitado inicial de exossomos isolados foi suspenso em 500 µL de 1 × PBS estéril; 1 µL desta solução foi subsequentemente diluído a 1:10.000 e separado para avaliação da distribuição de tamanho das micropartículas e sua concentração nas amostras, através do sistema NTA (Nanoparticle Tracking Analysis, equipamento NS300, NanoSight, Amesbury, UK) equipado com um laser de 532 nm. O NTA é um novo método de caracterização de nanopartículas *in vitro*, adequado para quantificar nanopartículas dispersas de amostras diluídas em tempo real e capaz de caracterizar frações de membrana, como exossomos. (85) As medições foram realizadas em triplicatas, com aproximadamente 2000 eventos gravados por mensuração. Esta técnica foi disponibilizada através de

[Digite aqui]

colaboração com a Profa. Eneida de Paula, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia - UNICAMP.

Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real.

RNA exossomal foi preparado utilizando-se o miRNeasy Micro Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). O precipitado resultante da suspensão de exossomos foi adicionado de 700 μ L do tampão QIAzol lysis buffer, e a mistura processada de acordo com protocolo do fabricante. Cinco ng do RNA extraído foi submetido à transcrição reversa com o miScript II RT kit (QIAGEN) e os níveis dos transcritos dos miRNA-223 e miRNA-22 foram avaliados por reação em cadeia pela polimerase em tempo real (real-time Polymerase Chain Reaction – RT-PCR), utilizando-se sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos em termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Três replicatas foram realizadas para cada amostra e foi calculado o valor médio de detecção nos ciclos (C(t)- threshold cycle value). O aumento ou decréscimo na expressão foi calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando-se os valores de C(t) do controle mir-192 como ponto de referência no caso das amostras de sangue periférico e U7 como controle no caso de exossomos derivados de células *in vitro*.

Geração de células dendríticas, análise fenotípica e pulso antigênico em culturas

A geração de células dendríticas *in vitro* a partir de leucócitos mononucleares de sangue periférico seguiu protocolo desenvolvido previamente em nosso laboratório em estudo liderado pela Dra. Simone Olencki Gilli (42) com modificações. Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas de frações leucoplaquetárias de bolsas de doadores de sangue saudáveis por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque™ (GE HealthCare, Life Sciences, EUA). Os monócitos foram isolados por centrifugação em gradiente de densidade Percoll seguida de aderência em plástico durante 2h. As DCs foram então geradas a partir dos monócitos aderentes, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA) com IL-4 (50 ng/mL, PeproTech Rochy Hill, NJ, EUA) e GM-CSF (50 ng/mL, PeproTech, Rochy Hill, NJ, EUA). DCs [Digite aqui]

maduras foram subsequentemente geradas por suplementação com TNF- α (50 ng/mL PeproTech Rocky Hill, NJ, EUA) e prostaglandina E2 (PGE2) (2,5 μ g/mL, Cayman Chemical). A análise fenotípica foi realizada utilizando anticorpos monoclonais contra CD11c (BD Biosciences, Califórnia, EUA), CD80, CD83 e HLA-DR (Caltag, CA, EUA) e a população de DCs foi selecionada na janela de células CD11c positivas.

As DCs foram pulsadas em coculturas com exossomos extraídos do soro de pacientes ou indivíduos saudáveis, exossomos derivados do sobrenadante da cultura de K562, ou lisados de células K562. A verificação da internalização dos exossomos nas DCs foi realizada por marcação com traçador CFSE (Molecular Probes / Invitrogen, EUA) e avaliação por imunofenotipagem após 1 hora de cocultura. Após 48h de incubação dos exossomos ou lisados tumorais com DCs, a maturação e viabilidade celular foram também analisadas por imunofenotipagem para expressão dos marcadores CD83, CD86 e 7AAD. Também foi realizada marcação com CD56 para excluir a possibilidade de que o efeito observado fosse decorrente de células Natural Killer contaminando o sistema.

Culturas de K562, lisados celulares e precipitação de exossomos dos sobrenadantes de culturas

A linhagem celular de leucemia humana K562 (complexo principal de histocompatibilidade [MHC] classe I-negativo) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC® CCL-243™). As células foram cultivadas a 37°C em 5% de CO₂ e mantidas em meio RPMI-1640 (Invitrogen®) suplementado com 10% de FBS. Para produção de lisados celulares, foram ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640 e lisadas por 5 ciclos alternando congelamento (freezer a -80°C, 30 min) e lavagem (temperatura ambiente, 10 min). A ruptura celular total foi validada microscopicamente usando coloração com azul de tripano. Após sonicação durante 10 minutos, o lisado foi centrifugado a 14.000 rpm (30 minutos, 4°C). O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -80°C para posterior utilização. Os exossomos dos sobrenadantes de K562 foram

precipitados utilizando o reagente ExoQuick-TC™ de acordo com as instruções do fabricante (System Biosciences, EUA).

Ensaio de citotoxicidade

DCs foram cocultivadas com células-alvo (K562) marcadas com CFSE em meio RPMI fresco / FBS a 10% em diferentes razões (1: 1, 0,5: 1, 0,25: 1). Para avaliar a citotoxicidade dependente de linfócitos, células T foram separadas de de camada leucoplaquetária resultante da separação de sangue total de doadores de sangue, por seleção imunomagnética (MACS) usando CD3-MicroBeads (Mitenyi Biotec, Alemanha) e cocultivadas em placas de 48 poços (5 x 10⁵ células/poço) com DCs (5x10⁴ células/poço) e K562 (5x10⁴ células/poço) durante 5 dias. As células foram então ressuspensas para avaliação de viabilidade em tampão de ligação contendo Anexina-V (BD, Nova Jersey, EUA). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram coradas com iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich). A análise de fluorescência foi realizada com um citômetro de fluxo FACScalibur (BD, Nova Jersey, EUA) utilizando o software Cell Quest (BD, Nova Jersey, EUA). A citotoxicidade em cada situação de cultura foi calculada pela frequência de células alvo positivas para coloração por PI, através da fórmula:

% de lise específica = 100– [(% células alvo viáveis na presença de DCs sob cada condição de pulso / % células viáveis na ausência de DCs) x 100].

A secreção de IFN- γ por linfócitos após a incubação com DCs sob diferentes pulsos antigênicos foi avaliada por imunofenotipagem utilizando anticorpo monoclonal contra IFN- γ (BD Biosciences, Califórnia, EUA) em células CD3 positivas.

Ensaio de diferenciação celular granulocítica-monocítica

Progenitores CD34+ foram purificados de sangue de cordão umbilical através de seleção imunomagnética positiva e expandidos em culturas em meio suplementado com G-CSF, IL-3 e SCF. Os níveis de expressão de mir-223 e mir-
[Digite aqui]

22 foram analisados nas células em cultura nos dias 0, 3, 5, 7, 11 e 14; expressão de CD34, CD45, CD14 e CD15 foi verificada através de citometria de fluxo e as mudanças morfológicas foram observadas com coloração de Wright-Giemsa em esfregaços de suspensões celulares no início das culturas, após 7 dias e no último dia de cultura.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software R versão 3.5.1, Copyright (C) 2018, The R Foundation for Statistical Computing. Teste de soma de postos de Wilcoxon (não normal) ou um teste t de Student (normal) foi usado para testar a significância estatística de diferenças de grupos. As relações entre expressão de microRNAs e demais variáveis analisadas foram testadas através de coeficiente de correlação de postos de Spearman. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinação da significância das diferenças encontradas entre médias de valores quando comparados os diferentes grupos de pacientes e controles. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterização estrutural dos exossomos extraídos de soro de pacientes e controles normais

As características dos indivíduos controles e pacientes admitidos neste estudo estão resumidas na Tabela 5. Os pacientes com SMD foram divididos em duas categorias de risco baseados no escore prognóstico IPSS ao diagnóstico: baixo risco (escore IPSS baixo ou int-1) e alto risco (escore IPSS int-2 ou alto).

	N	SEXO (F/M)	IDADE: MED (MIN-MAX)
CONTROLES	19	9/10	47(29-66)
SMD- BAIXO RISCO	21	11/10	73(22-93)
SMD- ALTO RISCO	7	4/3	72 (32-83)
LMA	14	6/8	62(21-79)

Tabela 5. Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo.

As análises por NTA demonstraram variação de tamanho das partículas entre 80,2 a 272,9 nm considerando-se todos as amostras estudadas, e não houve diferença significativa dessa variável entre amostras de indivíduos saudáveis ou pacientes. A dispersão dessas variáveis entre as amostras pode ser observada em mais detalhes na Figura 2.

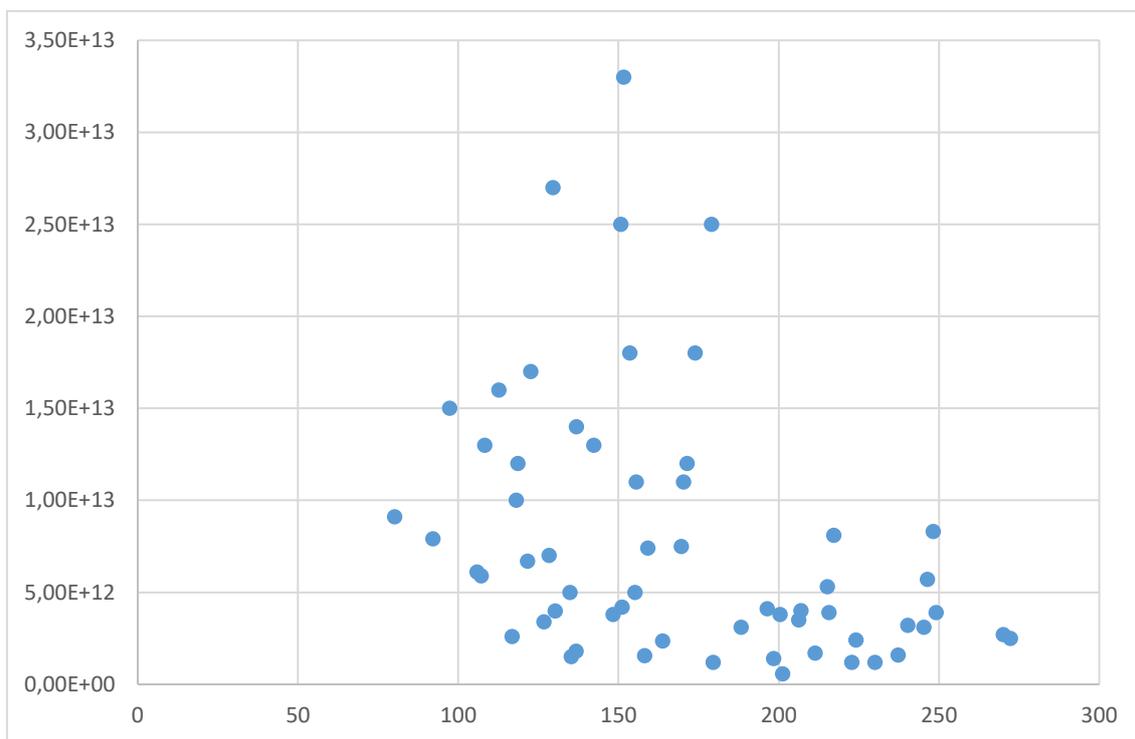


Figura 2. Representação da dispersão dos valores de tamanho médio em nanômetros (eixo X) e concentração de partículas nas amostras (número de partículas por μL de suspensão líquida, eixo Y). Cada ponto representa a interseção de valores obtidos pela análise de amostra de um indivíduo.

[Digite aqui]

Em relação ao número de partículas nas amostras, sua concentração variou de $5,6 \times 10^{11}$ a $3,3 \times 10^{13}$ por μL de suspensão líquida, com concentrações significativamente menores quando comparadas as amostras do grupo total de pacientes em relação aos controles normais (análise de variância- ANOVA; $p=0.004$), Figura 3.

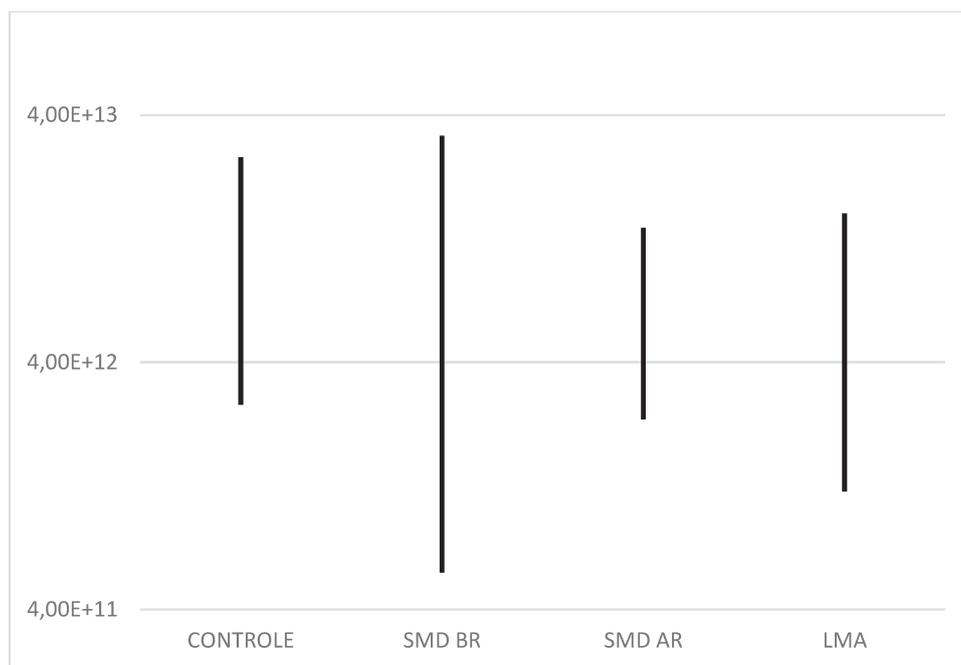


Figura 3. Comparação entre a concentração de partículas dispersas em solução, entre soro de controles normais e pacientes. As barras demonstram valor máximo, mínimo e mediana, em representação logarítmica. SMD BR: mielodisplasia de baixo risco, SMD AR: mielodisplasia de alto risco, LMA: leucemia mieloide aguda.

Padronização de mir-192 como controle endógeno para RT-PCR

Até o momento da realização deste trabalho, não havia descrição de padronização de um microRNA endógeno para estudos de expressão gênica por RT-PCR em exossomos de amostras de sangue periférico de pacientes com neoplasias mieloides. Foi optado então por testar o uso de mir-192 como controle endógeno, já que no caso de exossomos purificados de soro de pacientes com Leucemia Linfóide Crônica, este mostrou pouca variação de seus níveis de

[Digite aqui]

expressão entre as amostras testadas e pouca variação em relação a amostras de indivíduos normais. (106)

Inicialmente foi observado o CT nas curvas de amplificação para 14 amostras de indivíduos normais e 22 amostras de pacientes com LMA/SMD. Observou-se níveis de expressão estáveis entre as amostras testadas e sem diferença significativa entre amostras de indivíduos com doença ou controles normais ($p=0,18$), Figura 4. Portanto, demonstramos pela primeira vez a possibilidade de uso do mir-192 também como controle endógeno para estudo de microRNAs exossomais em amostras de pacientes com neoplasias mieloides.

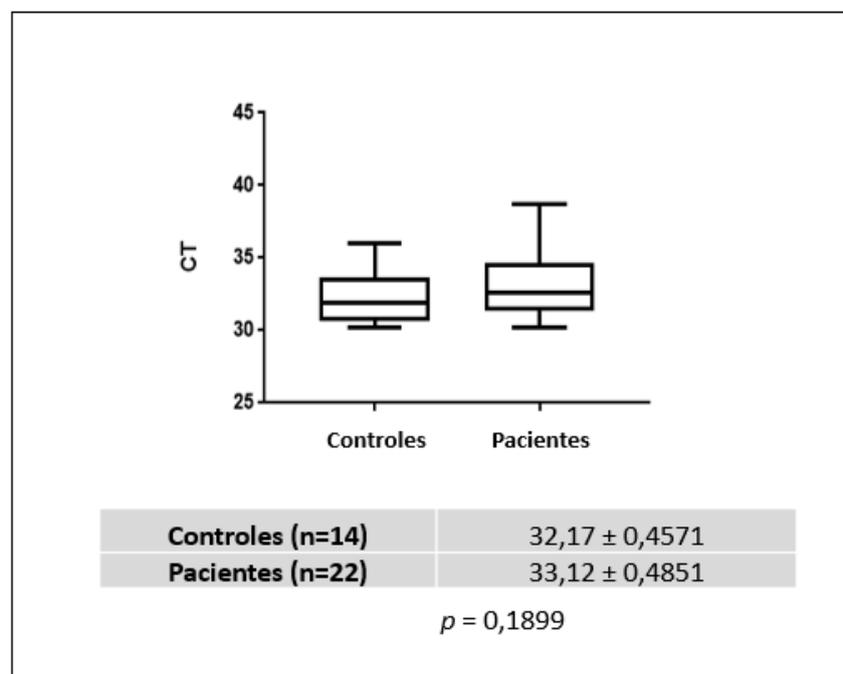


Figura 4. Padronização do mir-192 como controle endógeno para as reações de RT-PCR quantitativo para microRNAs nas neoplasias mieloides. Não houve variação significativa nos CT (cycle threshold) entre as amostras testadas de indivíduos com doença ou controles normais.

Avaliação da expressão de mir-223 e mir-22 em controles e pacientes e sua relação com dados clínicos e laboratoriais

Não houve diferença nos níveis de expressão de mir-22 entre os diferentes grupos de indivíduos testados. Em relação ao mir-223, foi possível observar diminuição estatisticamente significativa de sua expressão em amostras de indivíduos portadores de mielodisplasia de alto risco em comparação com indivíduos saudáveis ($p=0.002$), assim como em relação a portadores de mielodisplasia de baixo risco ($p=0.012$). Não houve diferença quando comparados indivíduos normais ou portadores de mielodisplasia em relação a indivíduos com diagnóstico de LMA.

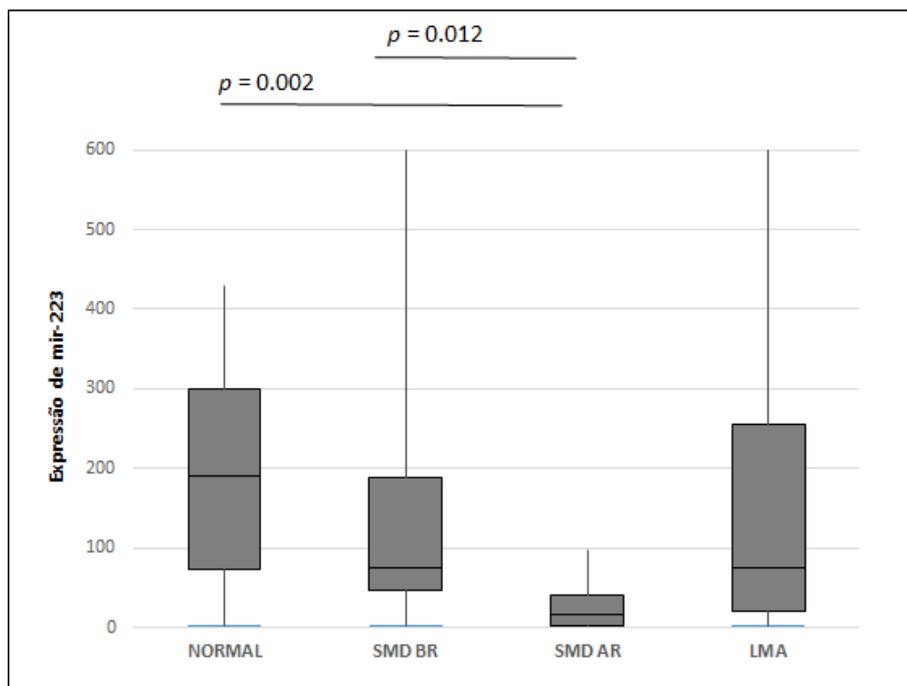


Figura 5. Comparação dos níveis de expressão de mir-223 entre os grupos de pacientes e indivíduos saudáveis. SMD BR: mielodisplasia de baixo risco; SMD AR: mielodisplasia de alto risco; LMA: leucemia mieloide aguda. Demonstrados resultados de análise de variância (ANOVA), resultados considerados significativos quando $p < 0.05$.

Observamos, no grupo de pacientes, correlação estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos totais em sangue periférico e a expressão tanto de mir-223 (Spearman's $r_s = 0.37$, $p = 0.003$), quanto mir-22 ($r_s = 0.43$, $p = 0.005$). No caso específico de mir-223, essa correlação positiva se

[Digite aqui]

estendeu ao número de neutrófilos ($r_s = 0.392$, $p = 0.002$), monócitos ($r_s = 0.484$, $p < .001$), linfócitos ($r_s = 0.442$, $p < .001$) e plaquetas ($r_s = 0.387$, $p = 0.002$).

Leucócitos totais	$r_s = 0.37$	$p = 0.003$
Neutrófilos	$r_s = 0.392$	$p = 0.002$
Monócitos	$r_s = 0.484$	$p < .001$
Linfócitos	$r_s = 0.442$	$p < .001$
Plaquetas	$r_s = 0.387$	$p = 0.002$

Tabela 6. Correlação dos níveis de mir-223 com contagens celulares no sangue periférico do grupo total de pacientes. Estão demonstrados o coeficiente de correlação de postos de Spearman, considerados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

Papel de mir-22 e mir-223 na diferenciação monocítica-granulocítica normal

Baseados nos dados de expressão de mir-223 e mir-22 e sua relação com contagem leucocitária, buscamos elucidar o papel desses dois transcritos no processo de diferenciação granulocítica e monocítica normais. (Figura 6)

Durante a diferenciação granulocítica-monocítica de células CD34+ humanas normais, observamos um aumento de mais de 12 vezes na expressão de mir-223 em células cultivadas após 5 dias, com declínio posterior mas mantendo um aumento de 8 vezes após 14 dias de cultura, com diferenciação granulocítica-monocítica demonstrada por citologia e imunofenotipagem com marcadores CD14 e CD15. No caso de mir-22, o aumento nos níveis desse transcrito mostrou-se progressivo e atingiu quase 30 vezes sua expressão inicial, no último dia de cultura. (Figura 7)

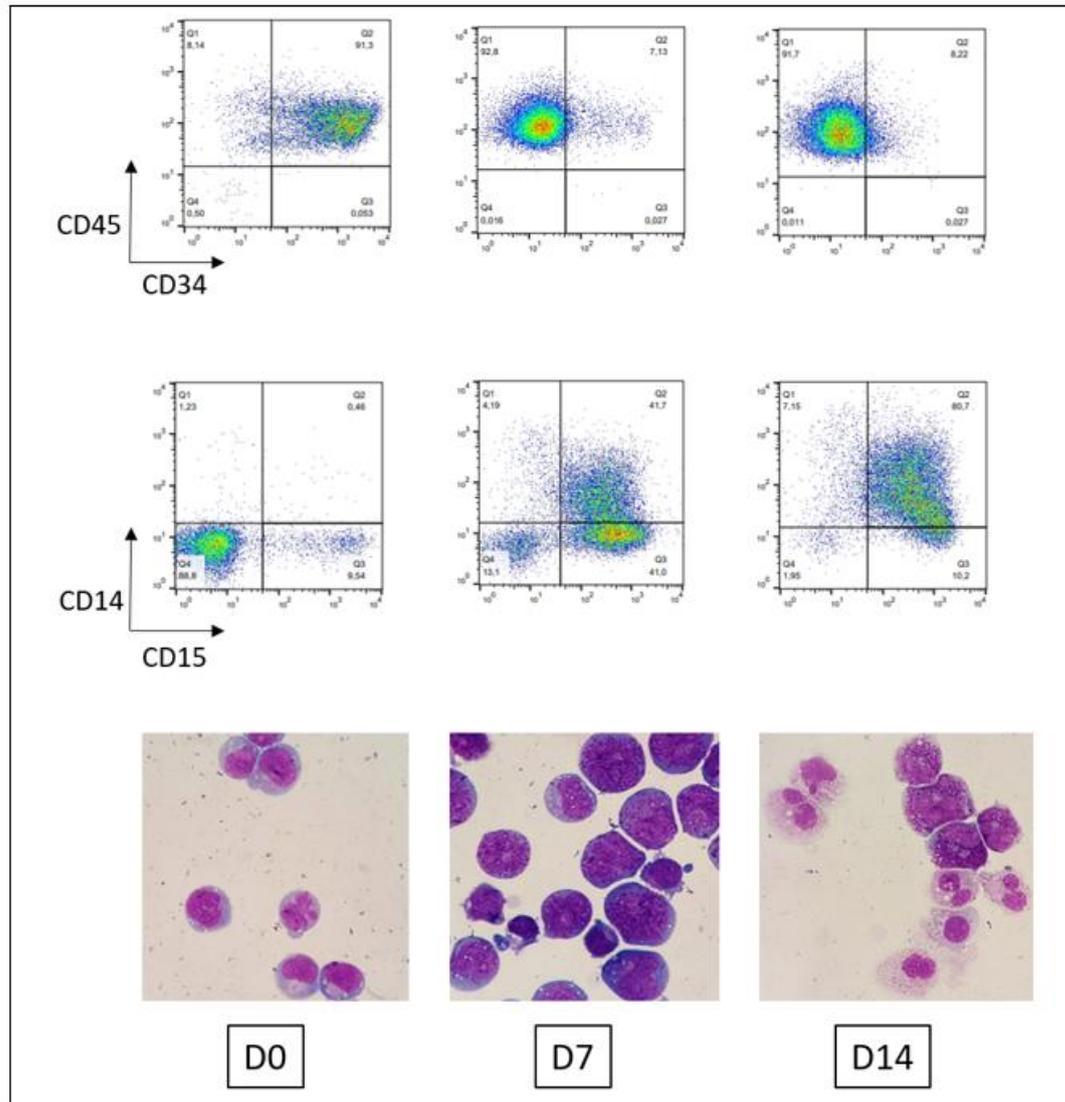


Figura 6. Ensaio de diferenciação granulocítica-monocítica de progenitores CD34+ purificados de sangue de cordão umbilical. A diferenciação de células tronco-hematopoiéticas nas séries granulocítica e monocítica pode ser visualizada através das diferenças morfológicas e por aumento da expressão de marcadores de diferenciação CD14, CD15 e CD45 e perda da expressão de CD34.

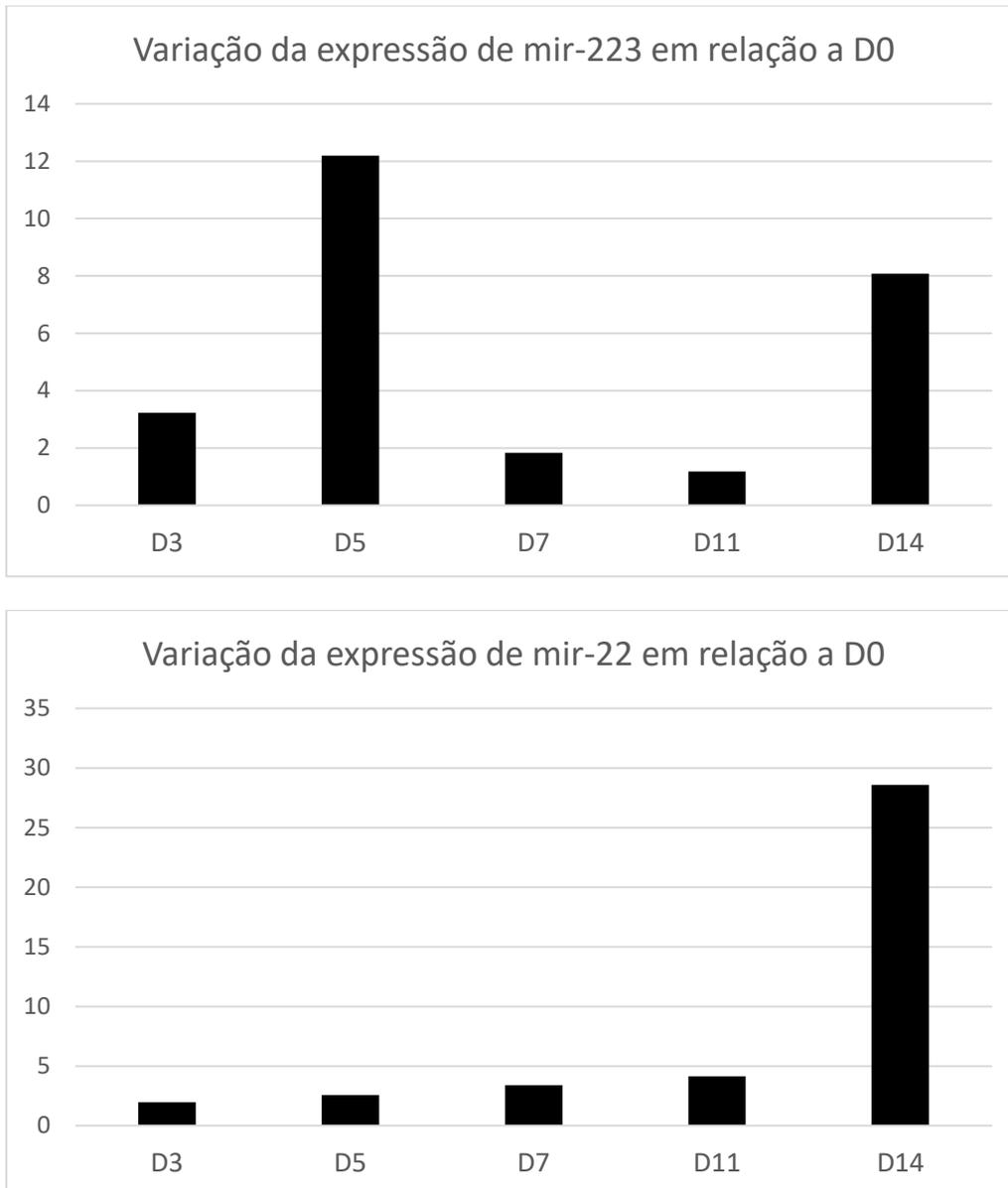


Figura 7. Modulação da expressão de mir-223 e mir-22 durante o processo de diferenciação granulocítica-monocítica das células tronco hematopoiéticas *in vitro*. Os resultados estão demonstrados como número de vezes no aumento da expressão em relação à expressão absoluta no D0.

[Digite aqui]

Exploração dos exossomos como nova fonte de pulso antigênico para imunoterapia com células dendríticas

Os exossomos derivados de LMA são efetivamente internalizados em DCs e suprimem a citotoxicidade de maneira dose-dependente

Os exossomos marcados com CFSE de um paciente com LMA foram adicionados a DCs em cultura e a sua internalização foi observada por imunofenotipagem. Após 1h de incubação, a incorporação de exossomos foi observada em aproximadamente 80% das DCs, comprovando sua eficiente internalização.

Ensaio de cocultura foram então realizados separadamente nas seguintes condições: i) DCs maduras ou imaturas, ii) não pulsadas ou pulsadas com exossomos, iii) incubadas apenas com K562 ou na presença de linfócitos. Células alvo (K562) marcadas com CFSE e cultivadas na ausência de DCs foram usadas para determinar a morte celular espontânea. Utilizaram-se percentagens de células alvo viáveis (PI/Anexina V negativa) para quantificar as respostas citotóxicas de acordo com a seguinte fórmula: % de lise específica = $100 - [(\% \text{ de células alvo viáveis na presença de DCs} / \% \text{ de células alvo viáveis sem DCs}) \times 100]$. O fluxo de experimentos para os estudos citotóxicos usando células alvo marcadas com CFSE podem ser visualizados em detalhes na Figura 8.

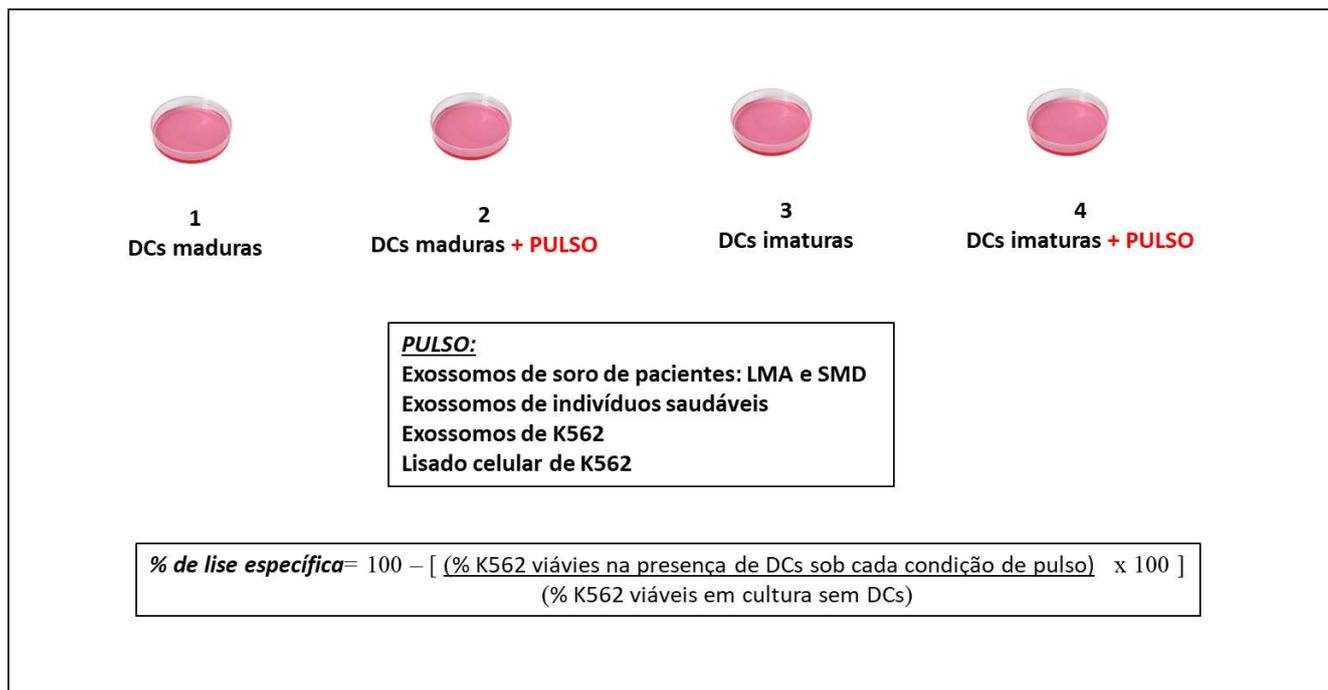


Figura 8. Representação do fluxo dos estudos de citotoxicidade utilizando células-alvo marcadas com CFSE.

Ambas as DC maduras e imaturas, não pulsadas, exibiram citotoxicidade *in vitro* contra K562, independentemente da ativação de linfócitos, e que deve corresponder à sua capacidade basal de captura de antígenos. A adição de exossomos extraídos do soro de um paciente diagnosticado com LMA, tanto em DCs maduras quanto imaturas, diminuiu a porcentagem de lise específica de K562, na presença ou não de linfócitos. Este efeito foi diretamente correlacionado ao número de DCs em cultura: concentrações mais altas de DCs pulsadas reduziram a lise de K562 perto de zero ou até mesmo permitiram aumento da proliferação de células leucêmicas, como observado na Figura 9.

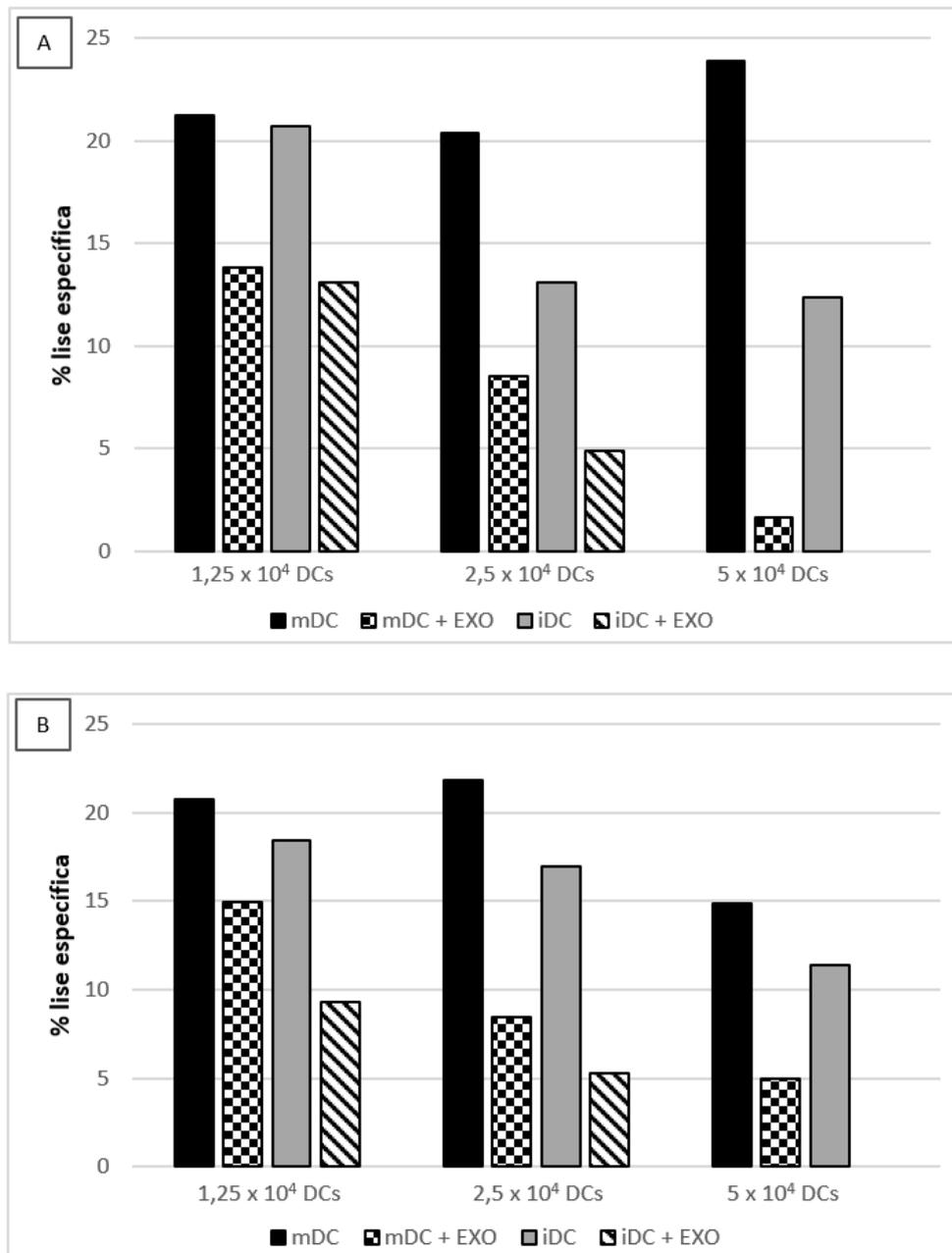


Figura 9. Percentual de lise específica de células leucêmicas K562 em contato com células dendríticas em diferentes condições de pulso e em 3 diferentes concentrações de DCs. A - na presença de linfócitos, B – citotoxicidade direta; mDC: DCs maduras, iDC: DCs imaturas.

Exosomos derivados de LMA suprimem a citotoxicidade mediada por DCs contra células K562, ao contrário dos lisados de K562 e dos exosomos isolados de sobrenadantes de culturas de K562

Realizamos os mesmos procedimentos experimentais com amostras de 8 pacientes com LMA, 2 pacientes com diagnóstico de SMD e 1 paciente com Leucemia Mieloide Crônica (as características dos pacientes estão detalhadas na Tabela 7). Os experimentos também foram realizados com DCs incubadas com exossomos de soro de 2 indivíduos saudáveis, para excluir a possibilidade de artefatos decorrentes simplesmente da adição das nanopartículas nas culturas. Além disso, esses experimentos também foram repetidos pulsando DCs maduras e imaturas com exosomos de sobrenadante das culturas de K562 e lisado de células K562 (como representativo de maior carga antigênica e considerado como controle positivo).

	Sexo	Idade	Classificação FAB	Citogenética	% blastos (MO)	% blastos (SP)	NPM1 mutante	FLT3 mutante
LMA 1	M	61	M4	46, XY	75	77	Sim	Sim
LMA 2	M	51	M4	46, XY	28	6	Não	Sim
LMA 3	M	34	M1	46, XY	98	86	Sim	Sim
LMA 4	M	47	M4	46, XY	57	77	Sim	Sim
LMA 5	F	41	M3	46,XX,t(15;17)(q22;q11)	93	0	Não	Não
LMA 6	M	57	M6	47,XY,+2/46,XY	26	3	Não	Não
LMA 7	M	65	M2	46,XY	63	23	Não	Não
LMA 8	M	72	M2	n/a	59	37	Não	Não
SMD 1	F	81	AREB-2	46,XX	11	0	n/a	n/a
SMD 2	M	79	SMD-t	46, XY	3	1	n/a	n/a
LMC	F	51	Fase crônica	46,XX,t(9;22)(q34;q11)	1	1	n/a	n/a

Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes cujas amostras foram analisadas nos ensaios de citotoxicidade.

LMA: Leucemia Mieloide Aguda, LMC: Leucemia Mieloide Crônica, SMD: Síndrome Mielodisplásica, AREB-2: Anemia refratária com excesso de blastos -2, SMD-t: Síndrome Mielodisplásica relacionada a terapêutica, MO: medula óssea, SP: sangue periférico, NPM1: Nucleophosmin 1, FLT3: FMS-like tyrosin kinase 3, FAB: classificação Franco-Americana-Britânica, n/a: não avaliado.

Para melhor comparação do potencial citotóxico das DCs sob diferentes condições de pulso, calculou-se a diferença entre as porcentagens de lise específica das células K562, observadas em cada situação, em relação àquela observada nas DCs não pulsadas, considerada como citotoxicidade basal. Esses resultados são mostrados na Figura 10.

No caso de DCs pulsadas com exossomos de pacientes, a diferença calculada resultou em valores negativos, evidenciando uma supressão na citotoxicidade, ao contrário das DCs pulsadas com exossomos de indivíduos normais, nas quais as diferenças na % de lise específica de K562 variaram em torno de zero. As únicas exceções a esse padrão foram 2 pacientes com LMA do tipo M2 (pacientes LMA7 e LMA8), com resultados semelhantes aos observados com exossomos de controles, e o caso da LMC, onde houve aumento da citotoxicidade em comparação com os outros pacientes. Entretanto, isso foi observado apenas em DCs maduras; DCs imaturas tiveram sua atividade citotóxica suprimida após pulso com exossomos de todos os pacientes testados.

Em relação às DCs maduras pulsadas com exossomos ou lisados de K562, pouca diferença na citotoxicidade foi observada em relação às DCs não pulsadas. No caso de DCs imaturas, observamos que o pulso com exossomos ou lisados de K562 aumentou notavelmente a lise de células-alvo, tanto na presença como na ausência de linfócitos (Figura 10B).

Avaliação do efeito de diferentes condições de pulso na maturação de DCs, proliferação de linfócitos e secreção de IFN- γ

Em todas as situações de pulso testadas, a diferenciação das DCs foi evidenciada pela alta expressão de CD11c, CD80 e HLA-DR associada à baixa expressão de CD14. A imunofenotipagem para CD56 foi sempre positiva em menos de 1% das células, excluindo a possibilidade de o efeito citotóxico observado ser a ação de células Natural Killer contaminantes. Além disso, sob todas as condições estudadas, mais de 90% das células expressaram níveis elevados de HLA-DR, excluindo também a possibilidade de que o efeito

imunossupressor observado fosse devido às células supressoras mielóides (*myeloid derived suppressor cells*).

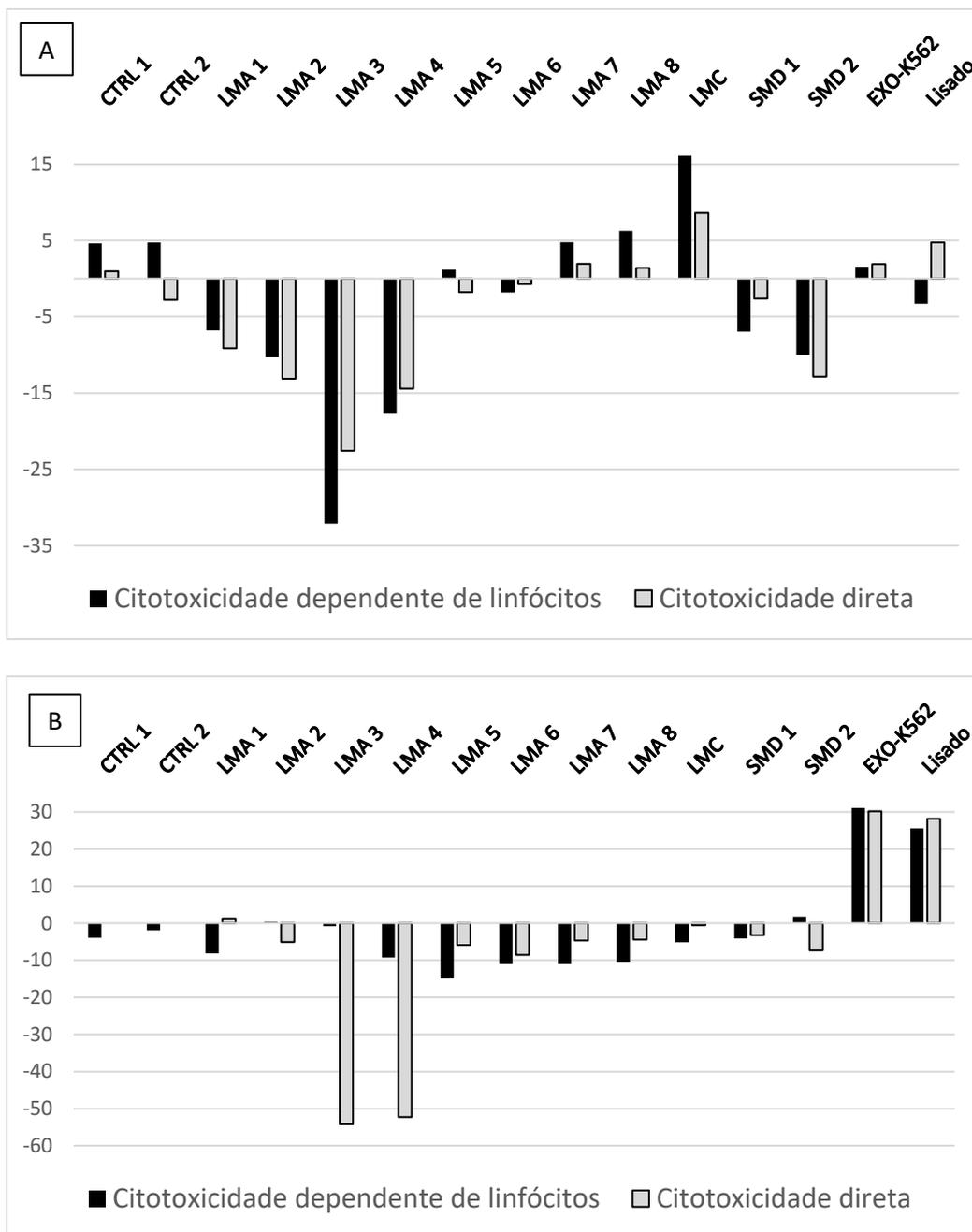


Figura 10. Diferenças da citotoxicidade mediada por DCs em diversas condições de pulso em relação a DCs não pulsadas, na presença ou ausência de linfócitos. A - DCs maduras, B - DCs sem fatores de maturação.

CTRL: controle saudável, LMA: Leucemia Mielóide Aguda, LMC: Leucemia Mielóide Crônica, SMD: Síndrome Mielodisplásicas

[Digite aqui]

A expressão do marcador de maturação CD83 permaneceu estável nas DCs maduras, independentemente de pulso. No entanto, houve um aumento substancial e inesperado na expressão de CD83 em DCs imaturas pulsadas com exossomos ou lisados de K562. (Figura 11) Contrariamente, a expressão de CD86 aumentou após pulso de células dendríticas com exossomos de pacientes com LMA, em relação a DCs não pulsadas, o que não ocorreu com células pulsadas com lisado de células tumorais K562.

Com relação aos efeitos das DC pulsadas sobre as células efectoras, observamos que diferentes condições de pulso não influenciaram as taxas de proliferação de linfócitos, uma vez que a contagem de linfócitos (avaliada por imunofenotipagem através da marcação com CD3) permaneceu estável sob as diferentes condições. Em seguida, questionamos se as DC pulsadas poderiam então ter diminuído a capacidade citotóxica dos linfócitos ao suprimir sua capacidade de produzir IFN- γ . Para comparação com DCs não pulsadas, os pacientes LMA5 e LMA6 foram escolhidos, uma vez que as maiores diminuições na citotoxicidade dependente de linfócitos em DCs imaturas foram observadas nesses dois casos e, portanto, seria mais provável encontrarmos diferenças mensuráveis indicando o efeito das DCs pulsadas sobre os linfócitos. DCs pulsadas com lisado de K562 e com exossomos do controle normal também foram comparadas. De fato, observamos uma redução significativa na produção de IFN- γ pelos linfócitos incubados com DCs pulsadas com exossomos dos pacientes LMA5 e LMA6, especialmente no caso de DCs imaturas (a Figura 12 mostra a porcentagem de produção de IFN- γ em cada situação em relação àquela observada em DCs não pulsadas). Curiosamente, houve uma relação inversa estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de IFN- γ e de CD86 considerando todas as situações analisadas ($p = 0,042$).

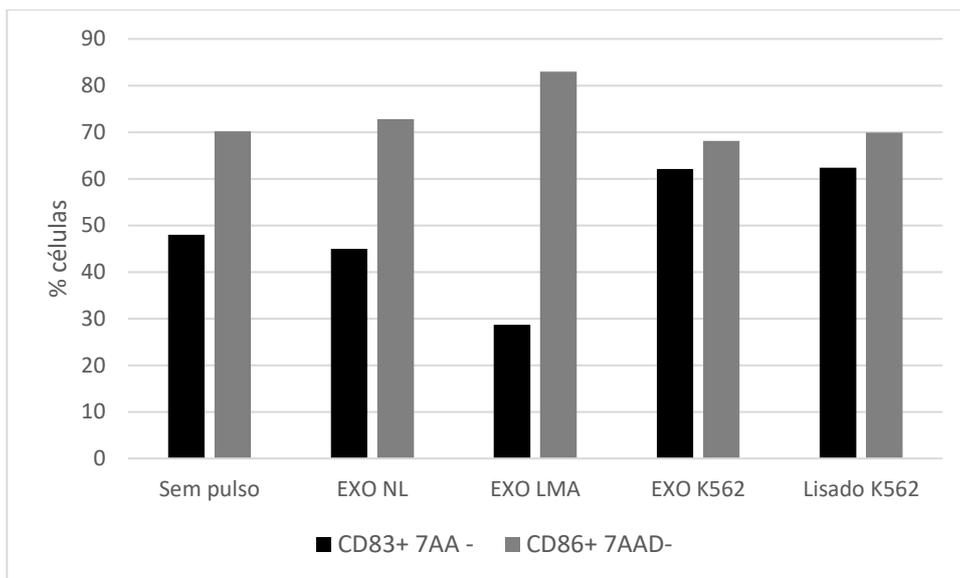


Figura 11. Expressão dos marcadores de maturação CD83 e CD86 em DCs imaturas após diferentes condições de pulso. Estão demonstradas as médias da porcentagem de células viáveis expressando os marcadores em cada situação.

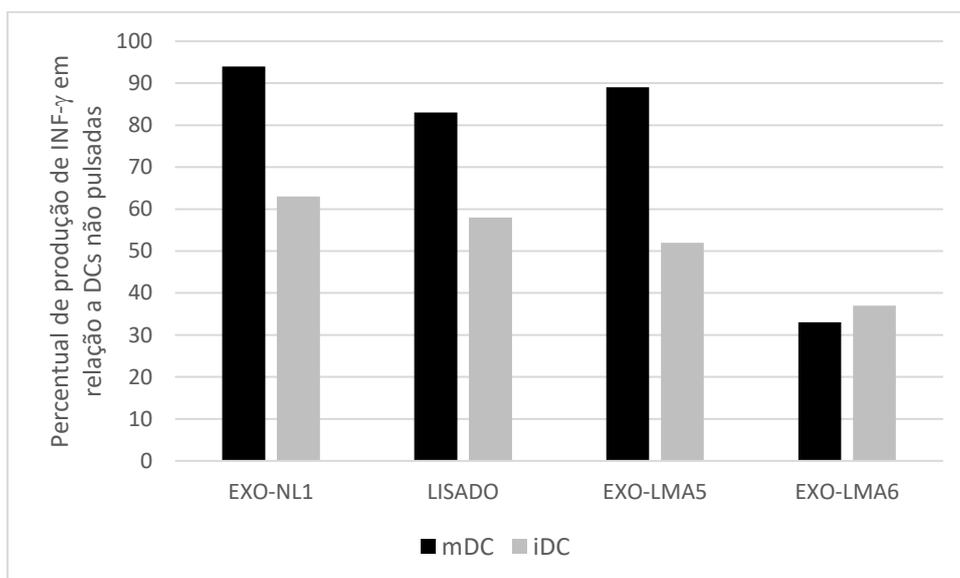


Figura. 12. Produção de IFN- γ por linfócitos incubados com DCs sob diferentes condições de pulso (em relação a linfócitos incubados com DCs não pulsadas).

DISCUSSÃO

Imunoterapia com células dendríticas tem se mostrado uma abordagem promissora como terapia de manutenção em pacientes com LMA, diminuindo as taxas de recidiva e aumentando sobrevida global. (45,57) A evolução das gerações de vacinas usando DCs passou por diversos incrementos, como melhorias nas técnicas de cultura celular e o refinamento na escolha de antígenos mais imunogênicos. Nesse sentido, o uso de exossomos como pulso antigênico para DCs pareceu ser particularmente interessante devido à possibilidade de conter um conjunto de antígenos específicos não só da doença mas também do paciente, e por sua mais fácil obtenção e manipulação.

No entanto, os resultados deste trabalho demonstram, surpreendentemente, que os exossomos derivados de soro dos pacientes com LMA parecem exercer um efeito de tolerância imunológica nas DCs. Isto deve corresponder a um mecanismo de evasão tumoral imunológica *in vivo*, uma vez que, curiosamente, os lisados de células leucêmicas ou exossomos derivados dessas células em cultura (K562) aumentaram notavelmente a citotoxicidade de DCs contra células alvo. Além disso, tanto os exossomos como lisados das células K562 induziram aumento da expressão do marcador CD83 em DCs imaturas, que é bem reconhecido como sendo importante para a estimulação da proliferação e ativação de linfócitos T CD8+ (107,108), através de mecanismos diversos como por exemplo o estímulo à liberação de cálcio das reservas intracelulares desses linfócitos. (109) Analisando esses fatos em conjunto, podemos especular que tanto exossomos como lisados de K562 têm a capacidade de aumentar a maturação das DCs e, simultaneamente, potencializar a resposta imune contra as células-alvo, ao contrário dos exossomos obtidos do sangue periférico dos pacientes.

De fato, por serem responsáveis pela ativação dos linfócitos T, as DCs também desempenham um papel importante no sensível equilíbrio entre resposta imune e tolerância. Estudos anteriores mostraram que DCs maduras podem limitar as respostas de células T efectoras e promover tolerância imunológica em resposta a diferentes moléculas sinalizadoras, como IL-27 e IL-10. (110,111) No caso de pacientes com câncer, exossomos circulantes

poderiam possivelmente ser gerados no microambiente tumoral, também contendo moléculas imunossupressoras, constituindo um mecanismo efetivo de indução parácrina da tolerância às células tumorais e, portanto, do escape tumoral. Nesse sentido, estudos recentes também demonstraram o potencial imunossupressor de vesículas extracelulares em gliomas (112), assim como exossomos derivados de câncer de próstata exibiram importante atividade supressora sobre as funções das DCs, resultando em menor ativação de linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ . (113)

Mesmo no caso de LMA, demonstrou-se recentemente que exossomos obtidos do soro de pacientes ao diagnóstico diminuem a atividade citotóxica de células NK isoladas de indivíduos normais. (114) Nossos resultados, entretanto, demonstram pela primeira vez esse fenômeno em células dendríticas, utilizando ensaios de citotoxicidade e avaliando de forma pormenorizada a atividade citotóxica própria das DCs, o efeito dos exossomos sobre o estado maturativo dessas células e os reflexos sobre sua capacidade de ativação linfocitária.

De fato, DCs pulsadas com exossomos de pacientes com LMA, apesar de não alterarem as taxas de proliferação dos linfócitos, levaram a uma diminuição acentuada na produção de IFN- γ por essas células efectoras, e os níveis de expressão de IFN- γ foram inversamente relacionados à expressão de CD86 nas DCs em coculturas. Há descrições de expressão anômala de CD86 em situações de resposta imune disfuncional, como em resposta à inflamação no lúpus eritematoso sistêmico (115) e um risco aumentado de recaída em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica e altas contagens de DCs expressando CD86. (116) Há evidências de que o aumento da expressão de CD86 em células apresentadoras de antígenos pode polarizar a resposta imune a um perfil Th2, com menor resposta Th1 e conseqüentemente menos citotoxicidade efetiva. (117) Portanto, podemos especular que em LMA, a supressão da citotoxicidade induzida por exossomos pode, pelo menos em parte, ser resultado de desregulação em moléculas coestimulatórias em DCs, como CD86, levando à diminuição da ativação de linfócitos com produção prejudicada de IFN- γ .

Na realidade, o que concluímos é que vacinas de DCs que utilizem outras fontes de pulso antigênico (como exossomos de células em cultura ou lisados

[Digite aqui]

tumorais) podem representar uma maneira viável e eficaz de maturar DCs em um fenótipo citotóxico, sem os efeitos imunossupressores observados com exossomos de pacientes e, portanto, merecem estudos adicionais para seu uso em imunoterapia.

Interessante notar que antes do desenvolvimento deste trabalho, estudo com modelo murino de LMA havia demonstrado a efetividade no uso de exossomos como pulso de DCs, inclusive com resultados superiores aos lisados tumorais. (118) Uma possível explicação para essa discrepância de resultados pode estar no fato de que o tumor não era autólogo, mas as células tumorais haviam sido injetadas nesses animais, o que pode não necessariamente mimetizar o ambiente imunossupressor como no caso da LMA em humanos. Isso pode explicar também a razão pela qual os resultados pré-clínicos promissores não foram reproduzidos em testes com células humanas. Em 2017, Huang et al. manipularam os exossomos derivados de células leucêmicas de forma a silenciar a expressão de TGF- β 1. Com essa abordagem, o pulso de DCs com esse material induziu resposta imune antitumoral mais potente do que com exossomos não manipulados, apontando novamente para o fato de que exossomos derivados de células neoplásicas podem conter moléculas com capacidade imunossupressora que prejudicam seu uso como pulso antigênico. (119)

Da mesma forma, outros estudos têm mostrado também os benefícios do uso de lisados tumorais como pulso antigênico. Por exemplo, em câncer de próstata, células dendríticas pulsadas com lisado tumoral mostraram bom perfil de segurança e levaram a respostas efetivas de células CD8+ e memória imunológica, resultando inclusive em quedas significativas nos níveis de PSA (antígeno prostático específico) em grande parte dos pacientes tratados. (120) Esses resultados corroboram nossos achados no caso da leucemia mieloide aguda, e tornaram-se a base para o planejamento de outros dois ensaios clínicos, nos quais avaliaremos essa abordagem para neoplasia de pulmão e mieloma múltiplo.

Uma limitação deste estudo foi o uso de linhagens leucêmicas para mimetizar o ataque citotóxico que deve ocorrer *in vivo*. Idealmente, teria sido

interessante usar como alvo os blastos leucêmicos do próprio paciente, porém essa abordagem apresenta algumas dificuldades de efetivação, principalmente em relação ao número de células viáveis necessárias para esses experimentos e a dificuldade de manutenção desses blastos em cultura pelo tempo necessário para a efetivação e observação dos fenômenos imunológicos de interesse para este estudo. Para trespassar essa limitação, escolhemos como alvo a linhagem leucêmica K562. Essas células foram imortalizadas a partir de um paciente com LMC em crise blástica, e portanto recapitulam as características de leucemia mieloide aguda (121), e foi a escolha para este estudo já que as outras linhagens disponíveis no laboratório são provenientes de células linfoides ou de leucemia promielocítica aguda (um tipo de leucemia gerada por uma translocação cromossômica específica, com fisiopatologia bastante particular em que os resultados obtidos não necessariamente poderiam ser extrapolados para os demais pacientes com LMA). Além disso, outra vantagem das células K562 é sua baixa expressão de moléculas MHC e, portanto, não restringindo o ataque citotóxico a esse tipo de reconhecimento imune. (122,123)

Interessante notar que avaliamos a resposta citotóxica também no caso de exossomos obtidos de um paciente com diagnóstico de Leucemia Mieloide Crônica, e esta foi a única situação em que houve aumento da citotoxicidade no caso das DCs maduras, apesar de pouco efeito sobre as DCs imaturas. Podemos especular que, ao contrário de LMA e SMD, os exossomos na LMC não levam a supressão da atividade das DCs e, contrariamente, aumentam o efeito citotóxico, podendo corresponder a uma estratégia interessante a ser avaliada no manejo de pacientes com falha de resposta ao tratamento convencional com inibidores de tirosinaquinase ou no caso de perda de resposta e instalação de crise blástica. Portanto, a ideia do uso de exossomos como pulso antigênico para células dendríticas não deve ser completamente descartada e pode ser uma estratégia interessante a ser explorada em outras neoplasias. Novas análises com maior número de casos serão necessárias para melhor elucidação do potencial dos exossomos em LMC e outros tumores. Além disso, um outro ponto a ser explorado nesse sentido seria o tempo de incubação dos linfócitos nesses sistemas *in vitro*. Apesar da maioria dos estudos avaliando linfocitotoxicidade e apresentados nas referências deste trabalho apontarem

[Digite aqui]

para um período de 5 dias para contato entre os linfócitos e as células dendríticas, é possível especular que um maior tempo de interação e apresentação antigênica possa levar a maior efetivação citotóxica, e esse aspecto também merece ser avaliado em novos estudos.

Uma outra limitação deste estudo foi a impossibilidade de caracterizar com mais detalhes o conteúdo interno dos exossomos dos pacientes em relação a quais componentes estariam diretamente envolvidos nessa resposta imunossupressora. Portanto, novos estudos que abordem especificamente essa questão devem ser conduzidos e permitirão a manipulação dessas nanopartículas para otimizar o efeito antitumoral. Entretanto, pudemos trazer novas informações quanto ao conteúdo de microRNAs presente nessas nanopartículas e sua relação com a expressão da doença. Apesar de não observarmos diferenças no tamanho e concentração dos exossomos entre pacientes e controles saudáveis, destacamos a menor expressão de mir-223 em exossomos de pacientes com mielodisplasia de alto risco, tanto em relação a indivíduos normais quanto a doença de baixo risco.

De fato, diversas observações têm apontado um importante papel de mir-223 no fenótipo agressivo de alguns tumores, principalmente em relação a resistência à quimioterapia em tumores sólidos, incluindo câncer de ovário (124), próstata (125) e glioblastoma (126). Contrariamente, em outros tipos de tumores como osteossarcoma (127), mir-223 teve na verdade um papel de aumento da quimiossensibilidade às drogas, apontando para efeitos desse microRNA dependentes de contexto ou específicos para cada tipo celular. Nesse sentido, nossos resultados estão de acordo com o que foi recentemente descrito por Merkerova *et al.*, que identificaram menores níveis de mir-223 circulante em SMD de alto risco, e que se relacionaram com sobrevida global nessa coorte de pacientes. (128) Portanto, no caso das SMD, parece de fato que a perda de expressão de mir-223 leva a um fenótipo de maior agressividade, ao contrário do que foi descrito na maioria dos tumores sólidos.

Interessante notar que houve correlação positiva entre os níveis de mir-223 e as contagens celulares no sangue periférico dos pacientes, notadamente neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas, e entre os níveis de mir-22 e as

contagens leucocitárias totais. Os estudos de diferenciação da célula tronco hematopoiética normal mostraram que há aumento nos níveis de mir-223 e mir-22 conforme há diferenciação para as séries granulocítica-monocítica, apontando para um provável papel de mir-223 e mir-22 na hematopoiese normal. No caso do mir-223 em especial, esses resultados corroboram a ideia de que sua supressão em SMD de alto risco pode corresponder a um mecanismo de maior agressividade da doença.

Portanto, podemos também especular que os níveis de mir-223 e mir-22 nos exossomos de pacientes com LMA e SMD possam corresponder a marcadores de diferenciação residual normal nessas doenças. Esses dados abrem a perspectiva para estudo desses possíveis biomarcadores em coortes com maior número de pacientes e outras situações clínicas de interesse, como por exemplo, a avaliação de enxerto neutrofílico em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas e monitoramento de recuperação medular após tratamento com drogas citotóxicas. Outro ponto a ser considerado caso comprovada essa importante função de mir-223 na diferenciação granulocítica seria estudar seu papel em doenças que cursam com neutropenia e a avaliação de possível abordagem terapêutica envolvendo indução de expressão desse microRNA como forma de terapia gênica.

Um último ponto a ser salientado deste trabalho é seu aspecto de inovação, já que buscou o aprimoramento de uma opção terapêutica ainda em fase experimental, mas que claramente apresenta oportunidades de melhoria. Esse aspecto pode ser observado também na metodologia empregada, usando reagentes e equipamentos apenas muito recentemente disponíveis (como polímeros para purificação de exossomos e a técnica de NTA). Além disso, essa linha de pesquisa em nosso laboratório permite que essas inovações cheguem até os pacientes do Sistema Único de Saúde, que não poderiam contar com imunoterapia fora de ensaios clínicos. Devemos salientar também que, para sua realização como projeto de pesquisa, e também como opção terapêutica atingindo os pacientes, este trabalho só foi possível graças ao estabelecimento de colaborações tanto dentro da própria universidade quanto em nível internacional, permitindo a transferência de tecnologias que beneficiam tanto o engrandecimento acadêmico da universidade quanto o cuidado dos pacientes.

[Digite aqui]

CONCLUSÕES

O que podemos concluir com este trabalho é que o estudo dos exossomos ainda se encontra em seus estágios iniciais de desenvolvimento, mas apresenta diversas utilidades potenciais ainda a serem exploradas, e que incluem o auxílio no diagnóstico, prognóstico e no tratamento das neoplasias hematológicas. Os resultados apresentados apontam para a possibilidade de microRNAs exossomais como marcadores de situações tanto fisiológicas quanto patológicas, neste último caso auxiliando no acompanhamento de pacientes e possivelmente surpreendendo eventos clínicos (como recidiva) de forma acurada, precoce, e menos invasiva. Além disso, este trabalho apontou também a possibilidade de uso de fontes alternativas de pulso antigênico, como lisado tumoral ou exossomos de culturas celulares, como material antigênico a ser explorado em novas formas de imunoterapia antitumoral.

PLANEJAMENTO FUTURO

Ainda serão realizados novos ensaios para melhor clarificação do papel de mir-223 e mir-22 na diferenciação das células hematopoiéticas, através de seu silenciamento e hiperexpressão em células tronco e observação dos efeitos sobre a diferenciação até granulócitos e monócitos. Essa abordagem também será utilizada para avaliação do efeito sobre esses microRNAs de drogas hipometilantes (como a azacitidina), principal elemento terapêutico disponível atualmente nas síndromes mielodisplásicas e cujo mecanismo de atuação e efeito sobre o sistema hematopoiético ainda não foi completamente elucidado.

Além disso, o mesmo modelo de avaliação de citotoxicidade das células dendríticas será empregado para avaliar a possibilidade de novas formas de imunoterapia para outras doenças. Para tal serão avaliados os efeitos sobre as DCs de lisados tumorais de plasmócitos de pacientes com mieloma múltiplo e lisados de adenocarcinoma de pulmão (este último em conjunto com equipe da Pneumologia).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO ALUNO NO PERÍODO DO ESTUDO

[Digite aqui]

Específica deste projeto

Artigos científicos

1. **Benites BD**, da Silva Santos Duarte A, Longhini ALF, Santos I, Alvarez MC, de Moraes Ribeiro LN, Paula E, Saad STO. Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy. *Vaccine*. 2019 Mar 7;37(11):1377-1383. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.01.079.
2. **Benites BD**, Duarte ASS, Alvarez MC, Santos I, Ribeiro LNM, Paula E, Saad STO. mir-223 is Supressed in Exosomes of Patients with High-risk Myelodysplastic Syndromes and May be a Marker of Residual Granulocytic-monocytic Differentiation. (*em preparação para submissão*).
3. **Benites BD**, Alvarez MC, Saad STO. Small particles, big effects: the interplay between microvesicles and dendritic cells in antitumor immunity and immunotherapy. *Cells*. 2019. Dec 16;8(12). (*artigo de revisão a convite do editor para edição especial: "Tumor-Associated Myeloid Cells: From Basic Research to Clinical Application"*).
4. **Benites BD**, Duarte ASS, Gilli SCO, Saad STO. DC vaccine production under different methods with equivalent results: cost-effectiveness comparison with implications for developing countries. *Cells*. (*artigo de revisão a convite do editor para edição especial: "Dendritic Cells in Immunity and Inflammation", em preparação para submissão*).

Apresentações de trabalho e palestras em congressos

1. The Effects of Acute Myeloid Leukemia Derived Exosomes upon Dendritic Cell Mediated Cytotoxicity. ESH 4th International Conference on Acute Myeloid Leukemia, Molecular and Translational: Advances in Biology and Treatment. Estoril, Portugal, 2017. (Poster, travel grant)

2. The effects of Acute Myeloid Leukemia derived Exosomes upon Dendritic cell mediated Cytotoxicity: implications for Immunotherapy. HEMO 2017 - Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, Curitiba, Brasil. (Oral)
3. Exosomes in the Serum of Acute Myeloid Leukemia Patients Induce Immunotolerance and May Not be Useful for Immunotherapy. 15th International Symposium on Dendritic Cells, Aachen, Germany, 2018. (Poster, travel grant).
4. mir-223 is Supressed in Exosomes of Patients with High-risk Myelodysplatic Syndromes and May be a Marker of Residual Granulocytic-monocytic Differentiation. 24th European Hematology Association (EHA) Congress, Amsterdam, 2019 (Poster, travel grant).
5. "Imunoterapia contra o câncer". XXVIII Congresso Médico Acadêmico da UNICAMP – CoMAU, Campinas, SP, 26 de outubro de 2019 (palestra, convidado).

Geral

Artigos científicos

1. Ribeiro LB, Soares EA, Costa FF, Gilli SCO, Olalla Saad ST, **Benites BD**. The challenges of handling deferasirox in sickle cell disease patients older than 40 years. *Hematology*. 2019 Dec;24(1):596-600.
2. Tavares AHJ, **Benites BD**, Fertrin KY. Myocardial Iron Overload in Sickle Cell Disease: A Rare But Potentially Fatal Complication of Transfusion. *Transfus Med Rev*. 2019 May 2. pii: S0887-7963(19)30013-6. doi: 10.1016/j.tmr.2019.04.001.
3. Gilli IO, Vigorito AC, **Benites BD**. Revisiting old practices: More restricted indication of preoperative autologous blood donation in healthy bone marrow donors according to baseline hemoglobin levels. *Transfus Apher Sci*. 2019 Jun;58(3):323-325. doi: 10.1016/j.transci.2019.04.001.
4. **Benites BD**, Olalla-Saad ST. An update on arginine in sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2019 Apr;12(4):235-244. doi:10.1080/17474086.2019.1591948.

[Digite aqui]

5. **Benites BD**, Ianara SC, Bastos SO, Lino APBL, Costa FF, Gilli SCO, Saad STO. Echocardiographic abnormalities in patients with sickle cell/ β -thalassemia do not depend on the β -thalassemia phenotype. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.09.003>
6. Ferreira FA, **Benites BD**, Costa FF, Gilli SCO, Saad STO. Recombinant erythropoietin as alternative to red cell transfusion in sickle cell disease. *Vox Sang*. 2018. doi:10.1111/vox.12750
7. **Benites BD**, Rocha D, Andrade E, Godoy DT, Alvarez P, Addas-Carvalho M. Zika Virus and the Safety of Blood Supply in Brazil: A Retrospective Epidemiological Evaluation. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Nov 5. doi: 10.4269/ajtmh.17-0843.
8. **Benites BD**, Addas-Carvalho M. Implementing a Patient Blood Management program in Brazil: challenges and implications for developing countries. *ISBT Sci Series*. 23 May 2018. <https://doi.org/10.1111/voxs.12433>
9. **Benites BD**. Reticulocytes and the storage lesion. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018 Apr-Jun;40(2):103-104.
10. Braga CCB, **Benites BD**, de Albuquerque DM, Alvarez MC, Seva-Pereira T, Duarte BKL, Costa FF, Gilli SCO, Saad STO. Deferasirox associated with liver failure and death in a sickle cell anemia patient homozygous for the -1774delG polymorphism in the Abcc2 gene. *Clinical Case Reports* 2017 Jun 15;5(8):1218-1221.
11. Gilli SC, Bastos SO, **Benites BD**, Costa FF, Saad ST. LDH and age are associated with hemolysis-endothelial dysfunction in HbSC patients. *Blood Cells Mol Dis*, 2016: Jul;59:119-23.
12. **Benites BD**, Bastos SO, Baldanzi G, Dos Santos AO, Ramos CD, Costa FF, Gilli SC, Saad ST. Sickle cell/ β -thalassemia: Comparison of S β 0 and S β + Brazilian patients followed at a single institution. *Hematology*, 2016: May; 28:1-7, 2016
13. Olenscki Gilli SC, Pericole FV, **Benites BD**, Sippert EÂ, Castilho LM, Addas-Carvalho M, Olalla Saad ST. Cytokine polymorphisms in sickle cell disease and the relationship with cytokine expression. *Exp Hematol*. 2016 Jul;44(7):583-9.

14. **Benites BD**, Benevides TC, Valente IS, Marques JF Jr, Gilli SC, Saad ST. The effects of exchange transfusion for prevention of complications during pregnancy of sickle hemoglobin C disease patients. *Transfusion*, 2016, Jan; 56(1):119-24, 2016.

Apresentações de trabalho em congressos

1. Revisiting Old Practices: More Restricted Indication of Preoperative Autologous Blood Donation in Healthy Bone Marrow Donors According to Baseline Hemoglobin Levels. 61th ASH Annual Meeting, American Society of Hematology, San Diego, 2018. (poster, travel grant)
2. Echocardiographic abnormalities in patients with sickle cell/ β -thalassemia do not depend on the β -thalassemia phenotype. 60th ASH Annual Meeting, American Society of Hematology, Atlanta, 2017 (poster, travel grant).
3. Difficulties in confirming cases of transfusion-transmitted pathogens: critical evaluation of Hemovigilance criteria. Hemo 2017 – Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, Curitiba, 2017 (poster).
4. Implementação de um programa Patient Blood Management em Hospital Universitário de Campinas, SP. Hemo 2017 – Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, Curitiba, 2017.

REFERÊNCIAS

1. Shumilov E, Flach J, Kohlmann A, Banz Y, Bonadies N, Fiedler M, et al. Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. *Blood Rev.* 2018;32(6):508–19.
2. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):934–46.
3. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(1):129–47.
4. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079–88.
5. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenau P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079–88.
6. Chen J, Kao YR, Sun D, Todorova TI, Reynolds D, Narayanagari SR, et al. Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nat Med.* 2019;25(1):103–10.
7. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet.* 2018;392(10147):593–606.
8. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70–87.
9. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control.* 2008;19(4):379–90.
10. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood.* 2017;129(12):1577–85.
11. Vardiman JW, Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of

[Digite aqui]

- myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
12. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan;129(4):424–47.
 13. Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(17):3147–56.
 14. Shah A, Andersson TML, Racht B, Björkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol*. 2013;162(4):509–16.
 15. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, Abelson S, Ng SWK, Trotman-Grant A, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*. 2017;547(7661):104–8.
 16. Pollyea DA. Which novel agents for acute myeloid leukemia are likely to change practice? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018;31(4):391–5.
 17. Ali N, Adil SN, Shaikh MU, Masood N. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Hematol Rep*. 2012;4(4):95–7.
 18. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med*. 2018;377(26):2565–79.
 19. Rumma J, Davies DJ, Cauchi MN. Effects of Graft-versus-Host Reaction on Inhibition of Tumor Growth in Vivo and on Tumor Cytotoxicity in Vitro¹. *Cancer Res*. 1977; 37(5): 1389–94.
 20. Maraninchi D, Blaise D, Rio B, Leblond V, Dreyfus F, Gluckman E, et al. Impact of T-Cell Depletion on Outcome of Allogeneic Bone-Marrow Transplantation for Standard-Risk Leukaemias. *Lancet*. 1987;330(8552):175–8.
 21. Labopin M, Gluckman E, Reiffers J, Vernant JP, Jouet JP, Harousseau JL, et al. Strong Antileukemic Effect of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Transplant Proc*. 1997;1345(96):733–4.
 22. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of Murine Leukaemia

- With X Rays and Homologous bone marrow. Preliminary communication. *Br Med J*. 1956;2:626–7.
23. Thomas ED, Remarkably L, Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance, and possible anti-leukemic effects. *Blood*. 1965;25(2):179-196. *Blood*. 2016;128(2):147.
 24. Pettitt D, Arshad Z, Smith J, Stanic T, Holländer G, Brindley D. CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape. *Mol Ther*. 2018;26(2):342–53.
 25. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439–48.
 26. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45–56.
 27. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol*. 2015;194(7):2985–91.
 28. Steinman, R.M.; Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 1973;137:1142–62.
 29. Macri C, Pang ES, Patton T, O’Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol* . 2018;84:11–21.
 30. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245–52.
 31. Sparwasser T, Wong P, Wu S, Ko K, Lang RA, Zavala F, et al. In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity*. 2004;17(2):211–20.
 32. Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, et al. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*.

- 2014;26(5):638–52.
33. Van Acker HH, Versteven M, Lichtenegger FS, Roex G, Campillo-Davo D, Lion E, et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2019;8(5):579.
 34. Barrett AJ, Le Blanc K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(2):223–32.
 35. Chijioke O, Münz C. Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. *Front Immunol*. 2013;4:1–7.
 36. Aldarouish M, Wang C. Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):1–13.
 37. Tang M, Diao J, Cattral MS. Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(5):761–76.
 38. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(12):941–52.
 39. Jonuleit' H, Kiihn' U, Miiller' G, Steinbrink' K, Paragnik' L, Schmitp E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions European Journal of Immunology Wiley Online Library. *Eur J Immunol*. 1997;27:3135–42.
 40. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996;196(2):137–51.
 41. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood*. 1997;90(9):3640–6.
 42. da Silva Simoneti G, Saad STO, Gilli SCO. An efficient protocol for the generation of monocyte derived dendritic cells using serum-free media for clinical applications in post remission AML patients. *Ann Clin Lab Sci*.

- 2014;44(2):180–8.
43. De Azevedo MTA, Saad STO, Gilli SCO. IL4 and IFN α generation of dendritic cells reveals great migratory potential and NF κ B and cJun expression in IL4DCs. *Immunol Invest*. 2013;42(8):711–25.
 44. Thomas-Kaskel AK, Zeiser R, Jochim R, Robbel C, Schultze-Seemann W, Waller CF, et al. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer*. 2006;119(10):2428–34.
 45. Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(31):13824–9.
 46. Tobiášová Z, Pospíšilová D, Miller AM, Minárik I, Sochorová K, Špíšek R, et al. In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients. *Clin Immunol*. 2007;122(1):18–27.
 47. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1996;2(1):52-8.
 48. Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, Hung YM, et al. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer*. 2005;103(4):763–71.
 49. Waeckerle-Men Y, Uetz-Von Allmen E, Fopp M, Von Moos R, Böhme C, Schmid HP, et al. Dendritic cell-based multi-epitope immunotherapy of hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(12):1524–33.
 50. Jung S-H, Lee H-J, Lee Y-K, Yang D-H, Kim H-J, Lee JH, et al. A Phase I Clinical Study of Autologous Dendritic Cell Therapy in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*.

- 2017;17(1):e129–30.
51. Qiu Y, Yun MM, Dong X, Xu M, Zhao R, Han X, et al. Combination of cytokine-induced killer and dendritic cells pulsed with antigenic α -1,3-galactosyl epitope-enhanced lymphoma cell membrane for effective B-cell lymphoma immunotherapy. *Cytotherapy* . 2016;18(1):91–8.
 52. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: A National Cancer Institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5323–37.
 53. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic J V., et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195–201.
 54. Gao L, Bellantuono I, Elsässer A, Marley SB, Gordon MY, Goldman JM, et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* . 2000;95(7):2198–203.
 55. Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis . *Expert Rev Mol Med*. 2007;9(14):1–17.
 56. F. Araujo Borges Jr, F. Traina, J. Machado-Neto, G. Simoneti, M. Lazarini, F. Costa, I. Lorand-Metze SOS. WT1, PR1, and PRAME antigens may be a good combination for immunotherapy in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res – Clin Lab Stud*. 2011;35(Supplement 1):S105-6.
 57. Anguille S, Van De Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, et al. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(15):1713–21.
 58. Chung DJ, Romano E, Pronschinske KB, Shyer JA, Mennecozzi M, Angelo ETS, et al. Langerhans-type and monocyte-derived human dendritic cells have different susceptibilities to mRNA electroporation with distinct effects

- on maturation and activation: Implications for immunogenicity in dendritic cell-based immunotherapy. *J Transl Med* . 2013;11(1):1.
59. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 2013;7(5):769–78.
 60. Fleming A, Sampey G, Chung MC, Bailey C, van Hoek ML, Kashanchi F, et al. The carrying pigeons of the cell: Exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog Dis*. 2014;71(2):107–18.
 61. Katsuda T, Ikeda S, Yoshioka Y, Kosaka N, Kawamata M, Ochiya T. Physiological and pathological relevance of secretory microRNAs and a perspective on their clinical application. *Biol Chem*. 2014;395(4):365–73.
 62. D’Souza-Schorey C, Schorey JS. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. *Essays Biochem* . 2018;62(2):125–33.
 63. Pan B, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron Microscopic Evidence for Externalization of the Transferrin Receptor in Vesicular Form in Sheep Reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101(3):942-8.
 64. Johnstone RM. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Mol Dis*. 2006;36(2):315–21.
 65. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–78.
 66. Heijnen BHFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: *Blood*. 1991;94(11):3791–9.
 67. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2014;103(4):530–41.
 68. Pei X, Li Y, Zhu L, Zhou Z. Astrocyte-derived exosomes suppress autophagy and ameliorate neuronal damage in experimental ischemic

- stroke. *Exp Cell Res* . 2019;(7):0–1.
69. Emanuelli C, Shearn AIU, Angelini GD, Sahoo S. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascul Pharmacol* . 2015;71:24–30.
 70. Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1772–81.
 71. Xu Y, Liu Y, Yang C, Kang L, Wang M, Hu J, et al. Macrophages transfer antigens to dendritic cells by releasing exosomes containing dead-cell-associated antigens partially through a ceramide-dependent pathway to enhance CD4⁺ T-cell responses. *Immunology*. 2016;149(2):157–71.
 72. Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, Topolar D, Simhadri VL, Nohroudi K, et al. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*. 2008;3(10).
 73. 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.
 74. Lu J, Wu J, Tian J, Wang S. Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunol Res*. 2018;66(3):313–22.
 75. Graner MW. Tumor-derived exosomes , microRNAs , and cancer immune suppression. *Semin Immunopathol*. 2018;40(5):505-515.
 76. Gu X, Erb U, Büchler MW, Zöller M.. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *Int J Cancer*. 2015;136(4):E74-84.
 77. Yao Y, Wang C, Wei W, Shen C, Deng X, Chen L, et al. Dendritic Cells Pulsed with Leukemia Cell-Derived Exosomes More Efficiently Induce Antileukemic Immunities. *PLoS One*. 2014;9(3):2–8.
 78. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, Distefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney*

- Int . 2012;82(9):1024–32.
79. Wang J, Yao Y, Wu J, Li G. Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6135–42.
 80. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol* . 2017;13(12):731–49.
 81. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(36):13368–73.
 82. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373–83.
 83. Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, Zocco D, Lari E, Radano G, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* . 2015;87:46–58.
 84. van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost*. 2014;12(7):1182–92.
 85. Ribeiro LNDM, Couto VM, Fraceto LF, De Paula E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–8.
 86. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* . 2004;116:281–97.
 87. Wallace JA, O’Connell RM. MicroRNAs and acute myeloid leukemia: Therapeutic implications and emerging concepts. *Blood*. 2017;130(11):1290–301.
 88. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;136(2):215–33.

89. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, et al. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br J Cancer* . 2015;113(2):275–81.
90. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer. *Tumor Biol* . 2016;37(8):10703–14.
91. Chen JJ, Zhao B, Zhao J, Li S. Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease. *Neural Plast* . 2017;2017:7027380.
92. Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*. 2015;6(35).
93. Kuppusamy KT, Sperber H. MicroRNA Regulation and Role in Stem Cell Maintenance , Cardiac Differentiation and Hypertrophy. *Curr Mol Med*. 2013;757–64.
94. Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP. Lineage Differentiation. *Science*. 2004;303(5654):83–6.
95. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008;451(7182):1125–9.
96. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013;121(6):984–95.
97. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, et al. Epigenetic Silencing of the Myelopoiesis Regulator microRNA-223 by the AML1/ETO Oncoprotein. *Cancer Cell*. 2007;12(5):457–66.
98. Zhou K, Yi S, Yu Z, Li Z, Wang Y, Zou D, et al. MicroRNA-223 expression is uniformly down-regulated in B cell lymphoproliferative disorders and is associated with poor survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* . 2012 Jun 1;53(6):1155–61.
99. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-kains B, Saussoy P, Neste E Van

- Den, Michaux L, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. sion levels decreased significantly with progression from Binet stage A to C were significantly lower in poor p. *Blood*. 2009;113(21):5237–45.
100. Chiaretti S, Messina M, Tavolaro S, Zardo G, Elia L, Vitale A, et al. Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica*. 2010;95(7):1114–21.
 101. Song SJ, Ito K, Ala U, Kats L, Webster K, Sun SM, et al. The oncogenic MicroRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. *Cell Stem Cell* . 2013;13(1):87–101.
 102. Jiang X, Hu C, Arnovitz S, Bugno J, Yu M, Zuo Z, et al. miR-22 has a potent anti-tumour role with therapeutic potential in acute myeloid leukaemia. *Nat Commun* . 2016 Apr 26;7:11452.
 103. Ling B, Wang G-X, Long G, Qiu J-H, Hu Z-L. Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3. *J Cancer Res Clin Oncol* . 2012;138(8):1355–61.
 104. Kong LM, Liao CG, Zhang Y, Xu J, Li Y, Huang W, et al. A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2014;74(14):3764–78.
 105. Palacios F, Abreu C, Prieto D, Morande P, Ruiz S, Fernández-Calero T, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*. 2014 May 14;29:115.
 106. Yeh Y, Ozer HG, Lehman AM, Maddocks K, Yu L, Johnson AJ, et al. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. 2019;125(21):3297–306.
 107. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with

- effective immune responses. *Eur J Immunol*. 2007;37(3):686–95.
108. Tze LE, Horikawa K, Domaschek H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med*. 2011;208(1):149–65.
109. Pinho MP, Migliori IK, Flatow EA, Barbuto JAM. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2014 May 1;95(5):755–62.
110. Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1054–63.
111. Bruchhage KL, Heinrichs S, Wollenberg B, Pries R. IL-10 in the microenvironment of HNSCC inhibits the CpG ODN-induced IFN- α secretion of PDCs. *Oncol Lett*. 2018;15(3):3985–90.
112. Hellwinkel JE, Redzic JS, Harland TA, Gunaydin D, Anchordoquy TJ, Graner MW. Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. *Neuro Oncol*. 2016;18(4):497–506.
113. Salimu J, Webber J, Gurney M, Al-taei S, Clayton A, Salimu J, et al. Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer-derived exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1).
114. Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):245–51.
115. Liu MF, Li JS, Weng TH, Lei HY. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. 1999;49(1):82–7.
116. Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia*. 2017;31(4):829–36.

117. Said EA, Al-Reesi I, Al-Riyami M, Al-Naamani K, Al-Sinawi S, Al-Balushi MS, et al. Increased CD86 but Not CD80 and PD-L1 expression on liver CD68+ cells during chronic HBV infection. *PLoS One*. 2016;11(6):1–13.
118. Gu X, Erb U, Büchler MW, Zöller M. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *Int J Cancer*. 2015;136(4):E74–84.
119. Huang F, Wan J, Hao S, Deng X, Chen L, Ma L. TGF- β 1-silenced leukemia cell-derived exosomes target dendritic cells to induce potent anti-leukemic immunity in a mouse model. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(10):1321–31.
120. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, Pereda C, Castello E. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2013;109(6):1488–97.
121. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J cancer*. 1976;18(4):421–31.
122. Day NE, Ugai H, Yokoyama KK, Ichiki AT. K-562 cells lack MHC class II expression due to an alternatively spliced CIITA transcript with a truncated coding region. *Leuk Res*. 2003;27(11):1027–38.
123. Moitreyee CK, S Agrawal, VK Singh, KB Mathur SA. Upregulation of HLA class I gene transcription in K562 cells by analogs of splemopentin (SP5). *Biochem Mol Biol Int*. 1997;41:521–528.
124. Zhu X, Shen H, Yin X, Yang M, Wei H, Chen Q, et al. Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1–14.
125. Feng Q, He P, Wang Y. MicroRNA-223-3p regulates cell chemo-sensitivity by targeting FOXO3 in prostatic cancer. *Gene* . 2018;658(32):152–8. Available from:
126. Huang BS, Luo QZ, Han Y, Huang D, Tang QP, Wu LX. MiR-223/PAX6 Axis Regulates Glioblastoma Stem Cell Proliferation and the Chemo

[Digite aqui]

Resistance to TMZ via Regulating PI3K/Akt Pathway. *J Cell Biochem.* 2017;118(10):3452–61.

127. Tang Q, Yuan Q, Li H, Wang W, Xie G, Zhu K, et al. miR-223/Hsp70/JNK/JUN/miR-223 feedback loop modulates the chemoresistance of osteosarcoma to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;497(3):827–34.
128. Merkerova MD, Hrustincova A, Krejcik Z, Votavova H, Ratajova E, Cermak J, et al. Microarray profiling defines circulating microRNAs associated with myelodysplastic syndromes. *Neoplasma.* 2017;64(4):571-578.

ANEXOS

[Digite aqui]

Aprovação pelo Comitê de Ética Médica institucional

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização estrutural e funcional dos exossomos nas Síndromes Mielodisplásicas

Pesquisador: Bruno Deltreggia Benites

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48897015.5.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.242.880

Apresentação do Projeto:

"Exossomos são microvesículas (30-150nm) formadas pela invaginação da membrana plasmática celular e com conteúdo diverso de proteínas, RNAm e especialmente microRNAs (miRNAs), pequenas sequências de RNA não codificadoras e que agem principalmente regulando expressão gênica. Os exossomos são secretados abundantemente por células tumorais, e modulam as células-alvo através da transferência de seu conteúdo, induzindo cascatas de sinalização que afetam diversas funções celulares. Sabe-se que o perfil de microRNAs nos exossomos é significativamente diferente de suas células de origem, indicando um mecanismo ativo de seleção e entrega desse material de uma célula a outra. A desregulação nesses miRNAs parece ter um papel importante no bloqueio de diferenciação, aumento das taxas apoptóticas e progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) que caracterizam as síndromes mielodisplásicas (SMD), através da modulação de oncogenes, genes supressores tumorais e mecanismos epigenéticos. O objetivo deste estudo é caracterizar o perfil dos exossomos em pacientes diagnosticados com SMD, com especial interesse em seu conteúdo interno de miRNAs sabidamente envolvidos em processos como hematopoiese, diferenciação celular e apoptose, e seu possível papel na modulação dessas funções em outras células. Serão selecionados para o estudo 50 pacientes (incluindo SMD de baixo e alto risco, e LMA secundária a SMD) e 20 doadores normais. Os exossomos serão purificados de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.242.880

amostra de soro através do reagente comercial ExoQuick™. O número de nanopartículas em cada amostra será verificado através do sistema Nanosight para caracterização de nanopartículas (Nanosight Ltd., Amesbury, UK), e sua estrutura será conferida através de microscopia eletrônica e Western Blot para proteínas específicas de exossomos (CD9 e CD63). A expressão dos miRNAs nos exossomos será quantificada por reação em cadeia pela polimerase em tempo real (real time PCR), e correlacionada com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Esses exossomos derivados de SMD serão também incubados com células CD34+ de doadores normais para avaliar o efeito dessas microvesículas sobre a proliferação, auto-renovação, diferenciação e apoptose das células tronco normais in vitro. Posteriormente, esses exossomos também serão testados como uma potencial fonte de antígenos para imunoterapia. Para esse propósito, células dendríticas serão co-cultivadas com exossomos derivados de SMD para avaliação de sua captura por essas células e a modulação da expressão de antígenos relacionados à doença (especialmente WT-1), além de sua habilidade para indução de linfocitotoxicidade.”

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é caracterizar o perfil dos exossomos em pacientes diagnosticados com SMD, com especial interesse em seu conteúdo de miRNAs sabidamente envolvidos em processos como hematopoiese, diferenciação celular e apoptose e seu possível papel na modulação dessas funções em outras células.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos associados aos desconfortos da punção venosa para colheita de sangue que, se ocorrerem, são de baixa gravidade, estarão descritos no TCLE e haverá disponibilidade de avaliação médica e tratamento caso necessário.

Não há benefícios diretos aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de doutorado do pós-graduando Bruno D. Benites (pesquisador responsável). Nesta pesquisa, pretende-se caracterizar o perfil dos exossomos em pacientes diagnosticados com SMD, com especial interesse em seu conteúdo de miRNAs. Para isso, pretende-se incluir 70 participantes na pesquisa, sendo 50 pacientes com síndrome mielodisplásica, com idade entre 18 e 70 anos e 20 indivíduos controles com idade pareada a dos pacientes. Serão colhidos 8ml de sangue venoso por punção periférica dos participantes. O convite para participar da pesquisa, bem como a colheita das amostras de sangue, serão realizados no

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.242.880

momento que participantes estiverem em atendimento na Unicamp.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável, Bruno D Benites e por Sara T. Allala Saad, Coordenador do Centro de Hematologia e Hemoterapia, Hemocentro de Campinas – Unicamp.
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido;
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto
4. Projeto completo.
5. Regulamento do birrepositório

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.242.880

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEPexosomos.pdf	21/07/2015 11:55:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLExosomos.pdf	21/07/2015 11:56:33		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoCEPexo.pdf	27/07/2015 11:32:00		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_557641.pdf	27/07/2015 11:32:23		Aceito
Outros	BiorrepositorioExosomos.pdf	17/08/2015 16:24:56		Aceito
Outros	CartaCEPexo.pdf	17/08/2015 16:25:16		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_557641.pdf	17/08/2015 16:26:05		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.242.880

CAMPINAS, 24 de Setembro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

[Digite aqui]



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Short communication

Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy [☆]

Bruno Deltreggia Benites ^{a,*}, Adriana da Silva Santos Duarte ^a, Ana Leda Figueiredo Longhini ^a, Irene Santos ^a, Marisa Claudia Alvarez ^a, Ligia Nunes de Moraes Ribeiro ^b, Eneida de Paula ^b, Sara Teresinha Olalla Saad ^a

^a Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

^b Department of Biochemistry and Tissue Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2018

Received in revised form 18 January 2019

Accepted 28 January 2019

Available online xxxx

Keywords:

Exosomes

Acute Myeloid Leukemia

Dendritic cells

Immunotherapy

ABSTRACT

Exosomes may represent an interesting antigenic pulse for new forms of anti-tumor immunotherapy. We evaluated exosomes from serum of patients with acute myeloid leukemia (AML) as an antigenic source for dendritic cells (DC) and the effects upon antitumor cytotoxicity, assessed by the percentage of specific lysis of K562 leukemic cells in co-cultures. Surprisingly, incubation of exosomes with DCs decreased lysis of K562, which may correspond to a mechanism of tumor evasion *in vivo*. However, when immature DCs were pulsed with exosomes purified from K562 culture supernatants, the lysis of target cells was notably enhanced, associated with a substantial increase in the expression of the maturation marker CD83. Thus, the development of vaccines using patients' exosomes would probably add no benefits to the treatment of AML; alternately, exosomes from cultured cells may represent an effective way for maturing DCs into a cytotoxic phenotype, without the immunosuppression observed with patients' exosomes.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Vaccines produced from dendritic cells (DCs) electroporated with Wilms Tumor 1 (WT1) mRNA have demonstrated good efficacy in preventing relapses in Acute Myeloid Leukemia (AML) patients [1,2]. However, the use of this therapy depends on the expression of WT1 in the blasts of the patient, which precludes the application for all individuals affected by the disease. Therefore, the search for new forms of antigenic pulse for immunotherapy with DCs is justified.

Exosomes are nanoparticles (50–200 nm) released extracellularly and bearing particular proteins, RNA and miRNAs profiles, with important functions in intercellular communication [3,4]. Due to their diverse internal content but dependent on the cells of origin [5,6], there is a growing interest in the use of these nanoparticles as personalized antigenic sources in the development of new forms of DC vaccines.

In this context, DCs pulsed with exosomes were shown to stimulate efficient cytotoxic responses and antitumor immunity in animal model [7]. In the specific case of AML, DCs pulsed with exosomes extracted from leukemia cell culture supernatants induced efficient cytotoxic responses translated into tumor size regression and longer survival of vaccinated mice [8]. Thus, the aim of this study was to evaluate the use of exosomes extracted from the serum of AML patients as an antigenic source for dendritic cell pulse and the effects upon antitumor cytotoxic responses.

2. Materials and methods

2.1. Exosome purification and characterization

Samples of venous blood (8 mL) were obtained from 8 patients newly diagnosed with AML, 2 patients with Myelodysplastic Syndromes (prior to any treatment), 1 patient with Chronic Myeloid Leukemia and 2 healthy blood donors. All subjects participating in this study signed an informed consent and the study was approved by the Hospital Ethics Committee.

Samples were processed through centrifugation at 3000 rpm for 10 min, and exosomes were isolated using the ExoQuick[®] exosome precipitation solution (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Exosomes concentration and size distribution were characterized by Nanoparti-

[☆] This study was supported by Grant no. 2011/51959-0 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

* Corresponding author at: Hematology and Transfusion Medicine Center, University of Campinas, Rua Carlos Chagas, 480, CEP: 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: benites@unicamp.br (B.D. Benites).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

0264-410X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, *Vaccine*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

cle Tracking Analysis (NTA) (NS300 equipment, NanoSight, Amesbury, UK) equipped with a 532 nm laser. NTA is a novel *in vitro* characterization method, adequate for quantifying dispersed nanoparticles of diluted samples in real time and capable of characterizing membrane fractions, such as exosomes [9,10]. The measurements were conducted in triplicates, with approximately 2000 tracks per measure.

2.2. Generation of DCs, phenotypic analysis and antigen pulsing

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats of healthy blood donors by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. Monocytes were isolated by Percoll density gradient centrifugation followed by adherence to a plastic dish for 2 h. DCs were generated from adherent monocytes in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) with IL-4 (50 ng/mL, PeproTech Rocky Hill, NJ, USA) and GM-CSF (50 ng/mL, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Mature DCs were generated by supplementation with TNF- α (50 ng/mL, PeproTech Rocky Hill, NJ, USA) and prostaglandin E2 (PGE2) (2.5 μ g/mL, Cayman Chemical). Phenotypic analysis was performed using monoclonal antibodies against CD11c (BD Biosciences, California, USA), CD80, CD83, and HLA-DR (Caltag, CA, USA) and the DC population was gated in CD11c positive cells.

DCs were pulsed in co-cultures with exosomes extracted from serum of patients or healthy individuals, exosomes derived from K562 culture supernatant, or K562 cell lysates. The verification of the internalization of the exosomes in the DCs was performed by marking with CFSE tracer (Molecular Probes/Invitrogen, USA) and evaluation by immunophenotyping after 1 h of co-culture. After 48 h of incubation of the exosomes or tumor lysates with DCs, maturation, cell viability and Natural Killer phenotype were also analyzed by immunophenotyping for expression of CD83/CD86, 7AAD and CD56 markers, respectively.

2.3. K562 cultures, cell lysates and exosome precipitation from supernatants

The human K562 leukemia cell line (major histocompatibility complex [MHC] class I-negative) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC[®] CCL-243[™]). The cells were cultured

at 37 °C in 5% CO₂ and maintained in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. K562 cells were resuspended in 1 mL of RPMI-1640 and lysed by 5 freezing (–80 °C freezer, 30 min) –thawing (room temperature, 10 min) cycles. Total cell disruption was microscopically validated using trypan blue staining. After sonication for 10 min, the lysate was centrifuged at 14,000 rpm (30 min, 4 °C). Supernatant was recovered and stored at –80 °C until use. Exosomes from K562 supernatants were precipitated using ExoQuick-TC[™] according to manufacturer's instructions (System Biosciences). Briefly, 40 mL of culture supernatant was mixed with 10 mL of ExoQuick-TC[™] solution by inverting the tube several times. The sample was incubated overnight at 4 °C, centrifuged twice at 1500g for 30 and 5 min, respectively, and the pellet was resuspended in 200 μ L PBS.

2.4. Cytotoxicity assays

DCs were harvested and cocultured overnight with CFSE-labeled target cells (K562) in fresh RPMI/10% FBS medium at different effector-to-target ratios (1:1, 0.5:1, 0.25:1). To assess the lymphocyte dependent cytotoxicity of DCs, T cells were separated from PBMC by magnetic cell selection (MACS) using CD3-MicroBeads (Mitenyi Biotec, Germany) and co-cultured in 48-well plates (5 \times 10⁵ cells /well) with DCs (5 \times 10⁴ cells /well) and K562 (5 \times 10⁴ cells /well) for 5 days.

The cells were then resuspended in Annexin-V-binding buffer (BD) containing Annexin-V-APC (1 mL/100 mL buffer; BD). After 15 min incubation at room temperature, samples were stained with propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich). Fluorescence analysis was performed with a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Secretion of INF- γ by lymphocytes after incubation with DCs under different antigenic pulses was assessed by immunophenotyping using monoclonal antibody against INF- γ (BD Biosciences, California, USA) in gated CD3 positive cells.

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software version 3.5.1, Copyright (C) 2018, The R Foundation for Statistical Computing [11]. Wilcoxon rank sum test (non-normal) or a Student's *t*-test

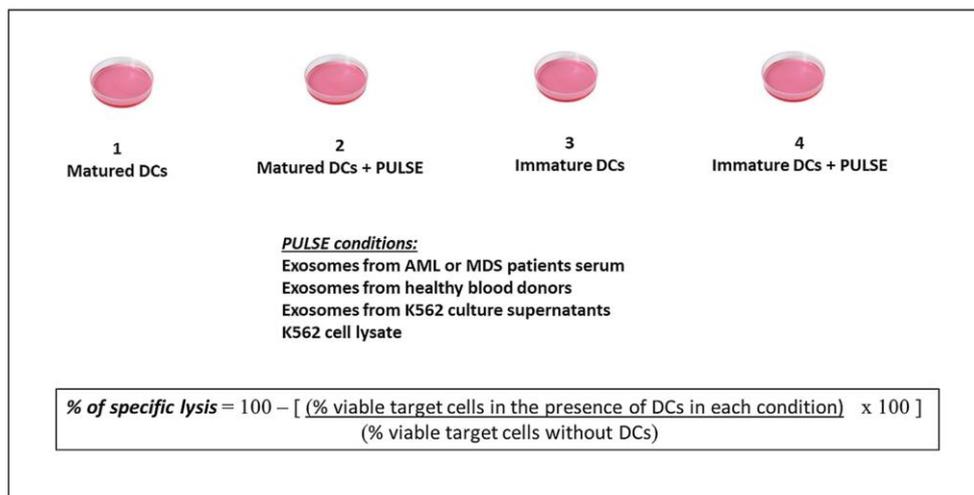


Fig. 1. Flow data for the cytotoxic studies using CFSE labeled target cells.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

(normal) was then used to test the statistical significance of group differences in characteristics as specific cytotoxicity or surface marker expression. Results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. AML derived exosomes are effectively internalized in DCs and suppress cytotoxicity in a dose dependent manner

CFSE-labeled exosomes from one AML patient were added to DC cultures and their internalization was observed by immunophenotyping. After 1 h of incubation, exosome incorporation was observed in approximately 80% of the DCs, proving their efficient internalization.

Co-culture assays were then performed separately under the following conditions: (i) mature or immature DCs, (ii) non-pulsed or pulsed with exosomes, (iii) incubated with K562 alone or in

the presence of lymphocytes. CFSE-labeled target cells cultured without DCs were used to determine spontaneous cell death. Percentages of viable target cells (PI/Annexin-V negative) were used to quantify the cytotoxic responses according to the following formula: % of specific lysis = $100 - [(\% \text{ viable target cells in the presence of DCs} / \% \text{ viable target cells without DCs}) \times 100]$. Flow data for the cytotoxic studies using CFSE labeled target cells can be visualized in detail in Fig. 1.

Both non-pulsed mature and immature DCs exhibited *in vitro* cytotoxic against K562, regardless of lymphocyte activation. The addition of exosomes extracted from the serum of a patient diagnosed with AML, in both mature and immature DCs, decreased the percentage of specific lysis of K562, in the presence or not of lymphocytes. This effect was directly correlated to the number of DCs in culture: higher concentrations of DCs reduced the lysis of K562 close to zero or actually increased proliferation of leukemic cells, as observed in Fig. 2.

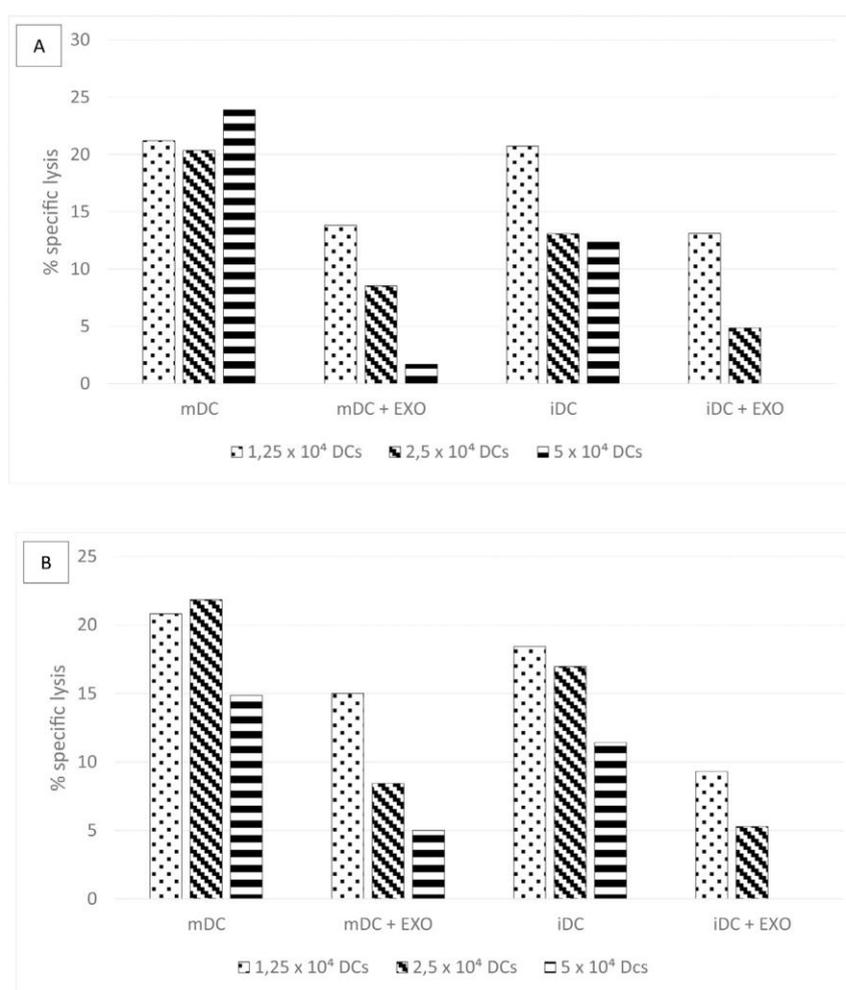


Fig. 2. Percentage of specific lysis of K562 leukemic cells upon contact with dendritic cells in different pulsing conditions. A – in the presence of lymphocytes, B – DCs direct cytotoxicity.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

3.2. AML derived exosomes suppress DCs mediated cytotoxicity against K562 cells, contrary to K562 lysates and exosomes from K562 culture supernatants

We performed the same experimental procedures with samples of 8 AML patients, 2 patients diagnosed with MDS, and 1 patient with Chronic Myeloid Leukemia (patients characteristics are detailed in Table 1). The experiments were also performed with DCs incubated with exosomes from serum of 2 healthy individuals, to exclude the possibility of artifacts by simply adding the nanoparticles into the cultures. Assessment by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) showed size distribution in the exosome range: median size 145.7 (95–229.2) nm. All samples were diluted to con-

tain approx. 10^{15} nanoparticles in 100 μ l suspension. In addition, these experiments were also repeated pulsing mature and immature DCs with K562-exo and K562-lysates (K562-lysates would be representative of higher antigenic load and considered as positive control).

For better comparison of the cytotoxic potential of DCs under different pulse conditions, we calculated the difference between the percentages of specific lysis of K562 cells, observed in each situation, in relation to that observed in non-pulsed DCs, which was considered as baseline cytotoxicity. These results are shown in Fig. 3.

In the case of DCs pulsed with patients' exosomes, the calculated difference resulted in negative values, evidencing a suppres-

Table 1

Patients clinical and laboratory data.

	Gender	Age	FAB classification	Cytogenetics	% blasts (BM)	% blasts (PB)	NP1 mutant	FLT3 mutant
AML 1	M	61	M4	46, XY	75	77	Yes	No
AML 2	M	51	M4	46, XY	28	6	No	No
AML 3	M	34	M1	46, XY	98	86	Yes	Yes
AML 4	M	47	M4	46, XY	57	77	Yes	Yes
AML 5	F	41	M3	46, XX,t(15;17)(q22;q11)	93	0	No	No
AML 6	M	57	M6	47, XY,+2/46,XY	26	3	No	No
AML 7	M	65	M2	46, XY	63	23	No	No
AML 8	M	72	M2	n/a	59	37	No	No
MDS 1	F	81	RAEB-2	46, XX	11	0	n/a	n/a
MDS 2	M	79	t-MDS	46, XY	3	1	n/a	n/a
CML	F	51	Chronic phase	46, XX,t(9;22)(q34;q11)	1	1	n/a	n/a

AML: Acute Myeloid Leukemia, CML: Chronic Myeloid Leukemia, MDS: Myelodysplastic Syndrome, RAEB-2: Refractory cytopenia with excess blasts -2, t-MDS: therapy-related Myelodysplastic Syndrome, BM: bone marrow, PB: peripheral blood, NP1: Nucleophosmin 1, FLT3: FMS-like tyrosin kinase 3, n/a: not available.

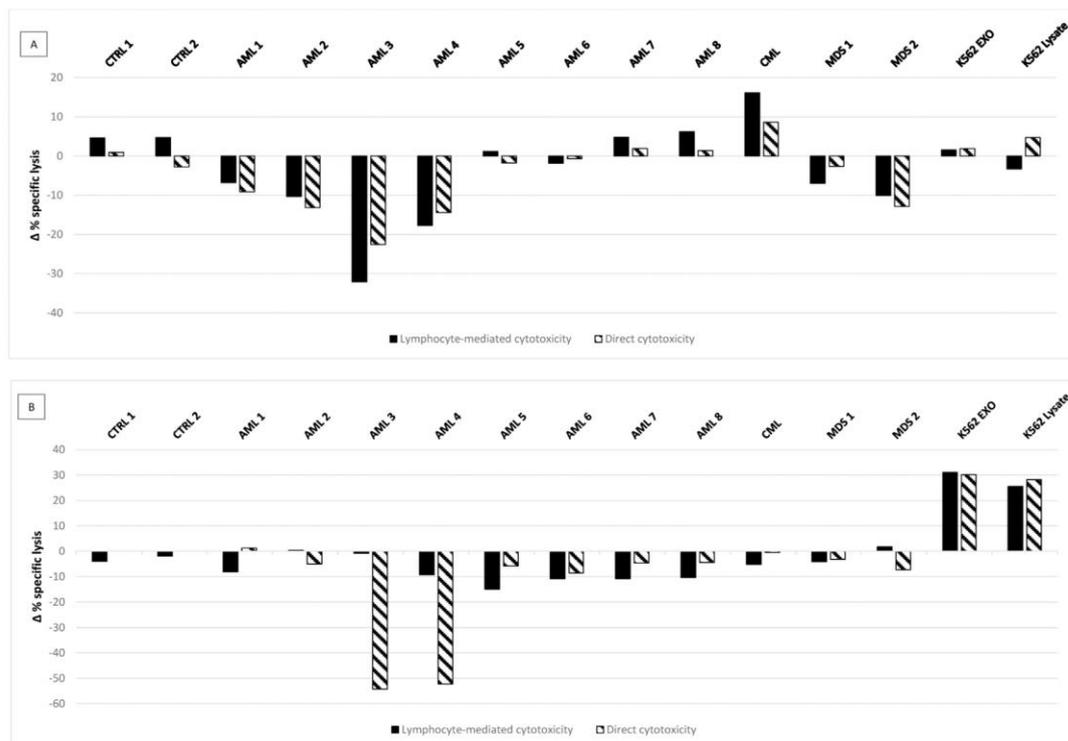


Fig. 3. Differences of DCs mediated cytotoxicity in diverse pulsing conditions in relation to non-pulsed DCs, in the presence or absence of lymphocytes. A – DCs matured in culture, B – DCs cultures without maturation factors.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

sion in cytotoxicity, contrarily to DCs pulsed with exosomes from normal individuals, in which the differences in % of specific lysis of K562 varied around zero. The only exceptions to this pattern were 2 patients with M2 type AML, with similar results to those using the exosomes of controls, and the case of CML, where there was a considerable increase in cytotoxicity compared to the other patients. However, this was observed only in matured DCs; immature DCs had their cytotoxic activity suppressed after pulsing with exosomes from all of the tested patients.

In matured DCs pulsed with K562 exosomes or lysates, little difference in cytotoxicity was observed in relation to non-pulsed DCs. In the case of immature DCs, we observed that pulsing with K562 exosomes or lysates notably enhanced the lysis of target cells, both in the presence or absence of lymphocytes (Fig. 3B).

3.3. Evaluation of the effect of different pulse conditions on DC maturation, lymphocyte proliferation and $INF-\gamma$ secretion

Phenotypic analysis of dendritic cells generated *in vitro* from peripheral blood mononuclear leukocytes can be visualized in

detail in Fig. 4. In all pulse situations tested, differentiation in DCs was evidenced through high expression of CD11c, CD80 and HLA-DR associated with low CD14 expression. Immunophenotyping for CD56 was always positive in less than 1% of the cells, excluding the possibility of the observed effect being the action of contaminating Natural Killer cells. In addition, under all conditions studied, more than 90% of the cells expressed high levels of HLA-DR, also excluding the possibility that the immunosuppressive effect observed was due to myeloid derived suppressor cells.

The expression of the maturation marker CD83 remained stable in matured DCs, regardless of pulsing. However, there was a substantial and unexpected increase in CD83 expression in immature DCs pulsed with K562 exosomes or lysates (Fig. 5). Contrarily, CD86 expression increased after pulsing of dendritic cells with AML patient exosomes, relative to non-pulsed DCs, which did not occur with cells pulsed with K562 tumor cell lysate (see Fig. 5).

Regarding the effects of pulsed DCs over effector cells, we observed that different pulsing conditions did not influence lymphocyte proliferation rates, since the lymphocyte counts (evalu-

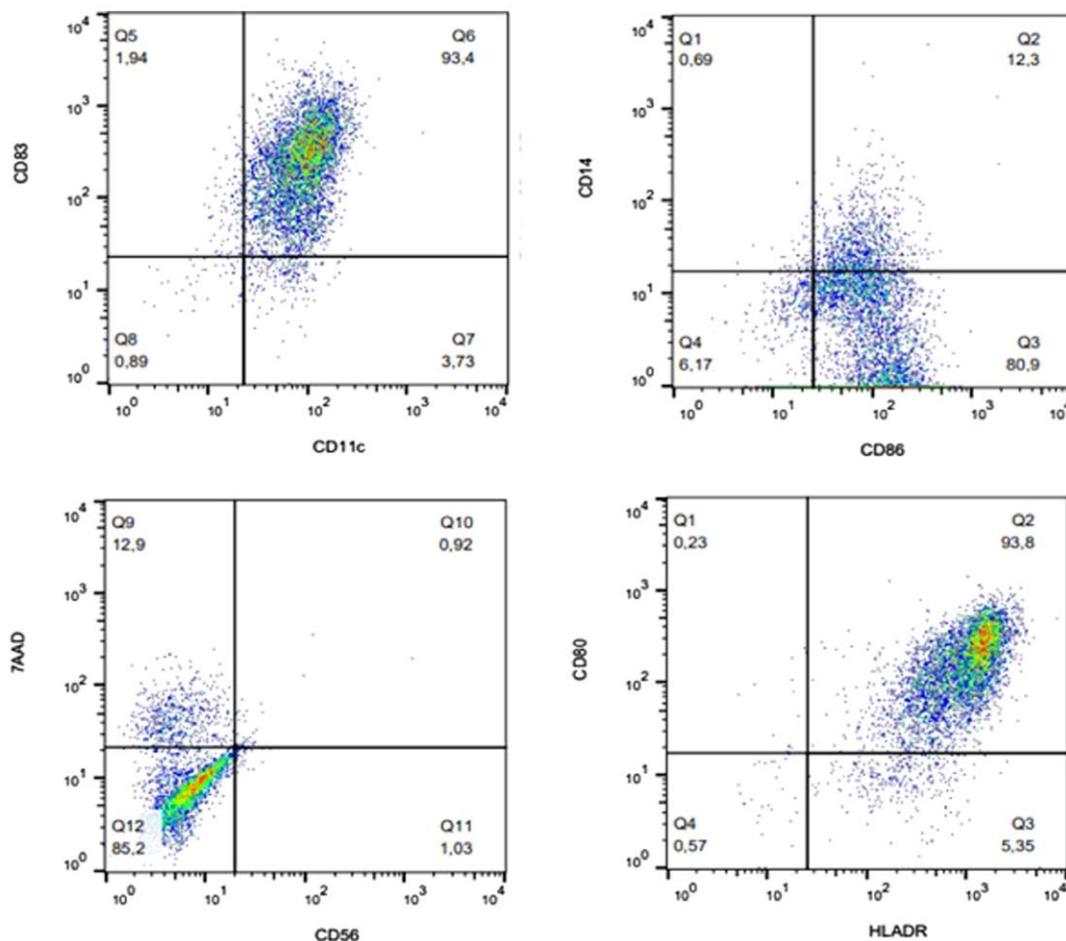


Fig. 4. Phenotypic analysis of dendritic cells generated *in vitro* after addition of maturation cytokines. This same panel was used for analysis and comparison of DCs generated under different pulse conditions.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

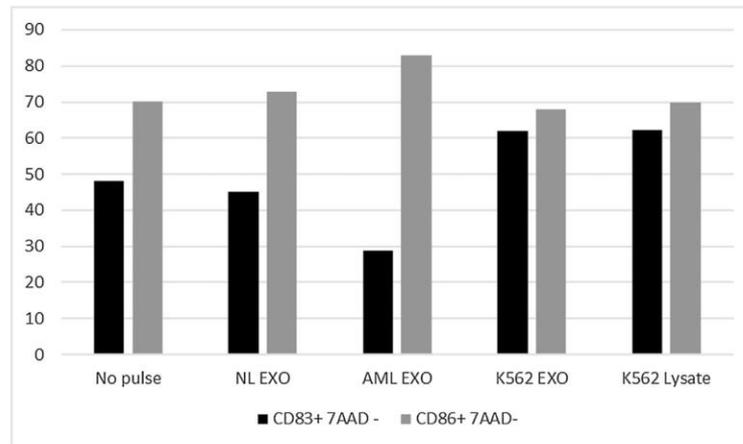


Fig. 5. Expression of the maturation markers CD83 and CD86 in immature DCs after different pulse conditions.

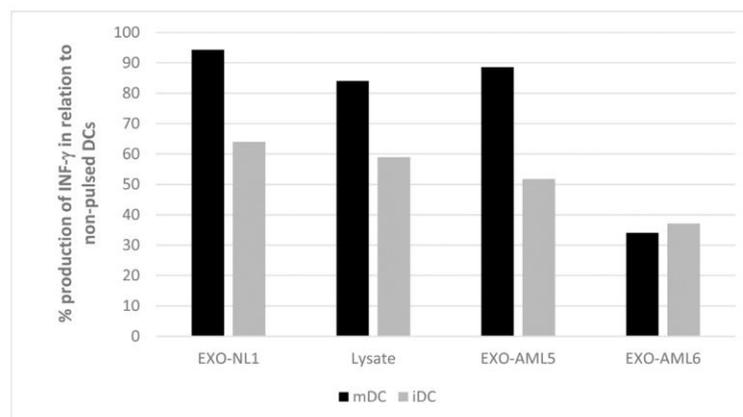


Fig. 6. % production of INF- γ by lymphocytes incubated with DCs under different pulse conditions (in relation to lymphocytes incubated with non-pulsed DCs).

ated by immunophenotyping through CD3 labeling) remained stable under different conditions.

We then questioned whether pulsed DCs decreased the cytotoxic capacity of lymphocytes by suppressing their capacity to produce INF- γ . For comparison with non-pulsed DCs, patients AML5 and AML6 were chosen since the largest decreases in lymphocyte-dependent cytotoxicity in immature DCs were observed in these two cases, and therefore we were more likely to find measurable differences indicating the effect of pulsed DCs on the lymphocytes. DCs pulsed with K562 lysate and with exosomes from normal control were also compared. In fact, we observed a significant reduction in the production of INF- γ by lymphocytes incubated with DCs pulsed with exosomes of patients AML5 and AML6, especially in the case of immature DCs (Fig. 6 shows the percentage of production of INF- γ in each situation in relation to that observed in non-pulsed DCs). Interestingly, there was a statistically significant inverse relationship between the levels of INF- γ and CD86 expression considering all analyzed situations ($p = 0.042$).

4. Discussion

Dendritic cell immunotherapy has been shown to be an interesting approach as maintenance therapy for Acute Myeloid Leukemias, decreasing relapse rates and increasing patient survival [1,2]. The use of exosomes as an antigenic pulse for DCs seems particularly interesting due to the possibility of containing a pool of antigens specific to the disease, and material easy to obtain and manipulate.

However, our results surprisingly demonstrated that AML-derived exosomes might exert an immune tolerance effect on DCs. This could correspond to a mechanism of immunological tumor evasion *in vivo* since, interestingly, K562 cell lysates or K562 derived exosomes notably enhanced DCs cytotoxicity against target cells. Moreover, K562 lysates and exosomes enhanced expression of CD83 in immature DCs. CD83 is well recognized to be important for stimulation of T cell proliferation and priming of CD8+ T lymphocytes [12,13]. Thus, taking both findings together, we can speculate that both K562 exosomes and lysates have the

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, Vaccine, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>

ability to enhance maturation of DCs and, simultaneously, enhance the immune response against target cells.

Dendritic cells are a fundamental element in the effectiveness of innate and adaptive immune responses, due to their role as professional antigen presenting cells. Recent studies however, have also explored their direct cytotoxic potential, observed in response to tumor cells, yielding the term “killer DCs” [14]. Anguille et al. demonstrated that these “killer DCs” stimulated with IL-15 exhibited CD56 upregulation, constituting a NK phenotype with high cytotoxic potential [15]. We also observed a direct cytotoxic effect of DCs against K562 cells, regardless of the presence of lymphocytes in co-cultures. However, in our study, the direct cytotoxic effect of DCs generated by K562 cell lysates and K562 exosomes did not depend on CD56 expression; possibly signifying that other pathways are also involved in the generation of this cytotoxic phenotype and may directly affect the maturation state of DCs, represented by higher positivity of CD83.

As they are responsible for the activation of T lymphocytes, DCs also play an important role in the sensitive balance between immune response and tolerance. Previous studies have shown that mature DCs can limit effector T cell responses and promote immune tolerance in response to different signaling molecules, such as IL-27 and IL-10 [16,17]. In the case of cancer patients, circulating exosomes could possibly be generated in the tumor microenvironment also containing immunosuppressive molecules, constituting an effective mechanism of paracrine induction of tolerance to tumor cells and therefore tumor escape. In fact, recent studies have also demonstrated the immunosuppressive potential of extracellular vesicles in gliomas [18], and even in the case of AML, exosomes obtained at diagnosis from patients' serum have been demonstrated to decrease cytotoxic activity of NK cells isolated from normal individuals [19].

In our study, DCs pulsed with AML patients exosomes, despite of not having altered lymphocyte proliferation, led to a marked decrease in the production of INF- γ by these effector cells, and INF- γ expression levels were inversely related to the expression of CD86 in co-cultured DCs. In fact, there are descriptions of anomalous expression of CD86 in situations of dysfunctional immune response, such as inadequate response of CD86 expression in response to inflammation in systemic lupus erythematosus [20] and an increased risk of relapse after discontinuation of treatment in patients with CML and high counts of DCs expressing CD86 [21]. There is evidence that increased induction of CD86 in antigen-presenting cells may polarize the immune response to a Th2 profile, with lower Th1 response and consequently less effective cytotoxicity [22]. Therefore, we may speculate that in AML, exosome-induced suppression of cytotoxicity may, at least in part, be a result of dysregulation in costimulatory molecules in DCs such as CD86, leading to decreased lymphocyte activation with impaired production of INF- γ .

In reality, what we conclude is that vaccines using other sources of exosomes for pulsing (such as exosomes from cultured cells) may represent a feasible and effective way for maturing DCs into a cytotoxic phenotype, without the immunosuppressive effects observed in patient exosomes, and therefore deserve further studies for their use in immunotherapy. One limitation of our study was that nor the internal contents of patients' exosomes were investigated, nor which components would be directly involved

in this immunosuppressive response. Therefore, new studies specifically addressing this issue should be conducted, and will enable the manipulation of these nanoparticles to optimize anti-tumor effect.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Anguille S et al. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood* 2017;130(15):1713–21.
- [2] Van Tendeloo VF et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(31):13824–9.
- [3] Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives. *Cancer Res* 2017;77(23):6480–8.
- [4] Zhao H et al. The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim Biophys Acta* 2017;1869(1):64–77.
- [5] Katsuda T et al. Physiological and pathological relevance of secretory microRNAs and a perspective on their clinical application. *Biol Chem* 2014;395(4):365–73.
- [6] Coleman BM, Hill AF. Extracellular vesicles - Their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2015;40:89–96.
- [7] Hao S et al. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyteresponses and antitumour immunity. *Immunology* 2007;120(1):90–102.
- [8] Yao Y et al. Dendritic cells pulsed with leukemia cell-derived exosomes more efficiently induce antileukemic immunities. *PLoS ONE* 2014;9(3):e91463.
- [9] Ribeiro LNM, Couto VM, Fraceto LF, de Paula E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. *Sci Rep* 2018;8(1):982.
- [10] Yeh YY et al. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood* 2015;125(21):3297–305.
- [11] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2013.
- [12] Aerts-Toegaert C et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 2007;37:686–95.
- [13] Tze LE et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 2011;208(1):149–65.
- [14] Tel J et al. Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol* 2014;35(1):38–46.
- [15] Anguille S et al. Interleukin-15-induced CD56(+) myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential. *PLoS ONE* 2012;7(12):e51851.
- [16] Mascanfroni ID et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol* 2013;14(10):1054–63.
- [17] Bruchhage KL, Heinrichs S, Wollenberg B, Pries R. IL-10 in the microenvironment of HNSCC inhibits the CpG ODN induced IFN- α secretion of pDCs. *Oncol Lett* 2018;15(3):3985–90.
- [18] Hellwinkel JE et al. Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. *Neuro Oncol* 2015;8. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov170>.
- [19] Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans* 2013;41(1):245–51.
- [20] Liu MF, Li JS, Weng TH, Lei HY. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1999;49(1):82–7.
- [21] Schütz C et al. Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia* 2018;32(4):1054.
- [22] Said EA et al. Increased CD86 but Not CD80 and PD-L1 Expression on Liver CD68+ Cells during Chronic HBV Infection. *PLoS ONE* 2016;11(6):e0158265.

Please cite this article as: B. D. Benites, A. da Silva Santos Duarte, A. L. F. Longhini et al., Exosomes in the serum of Acute Myeloid Leukemia patients induce dendritic cell tolerance: Implications for immunotherapy, *Vaccine*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.079>