

**ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS INDUZIDAS POR EXOSSOMOS
ALOGÊNICOS**

Rebeca Sayuri Salvucci Hama

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas

BOTUCATU-SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM CÉLULAS
DENDRÍTICAS INDUZIDAS POR EXOSSOMOS
ALOGÊNICOS**

Rebeca Sayuri Salvucci Hama

Orientadora: Graziela Gorete Romagnoli Castilho

Co-orientador: Ramon Kaneno

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas

BOTUCATU-SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Hama, Rebeca Sayuri Salvucci.

Alterações fenotípicas em células dendríticas induzidas por exossomos alogênicos : alogenicidade de exossomos em DCs / Rebeca Sayuri Salvucci Hama. - Botucatu, 2014

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Graziela Gorete Romagnoli Castilho

Coorientador: Ramon Kaneno

Capes: 21102007

1. Imunoterapia. 2. Antígenos. 3. Próstata - Câncer. 4. Células cancerosas. 5. Imunidade (Higiene)

Palavras-chave: Alogenicidade; Câncer; Célula Dendrítica; Exossomo; Próstata.

Rebeca Sayuri Salvucci Hama

Alterações fenotípicas em células dendríticas induzidas por
exossomos alogênicos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientadora: Dra. Graziela Gorete Romagnoli Castilho

Comissão examinadora

Dra. Graziela Gorete Romagnoli Castilho

Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Botucatu, _____de_____de_____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais com quem posso sempre contar, minha motivação para me tornar uma pessoa melhor a cada dia, são meus maiores exemplos e meus melhores amigos, dedico não só esta, mas todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Ramon Kaneno, que desde o início da minha graduação já contribuiu pelas excelentes aulas na disciplina de Imunologia, fazendo com que eu gostasse ainda mais desta área. Obrigada pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por seus ensinamentos, confiança e paciência que contribuíram muito na minha formação não só profissional como também pessoal.

À minha orientadora Dra Graziela Gorete Romagnoli Castilho, que tornou possível a conclusão desta monografia. Sua experiência e conhecimento foram fundamentais no meu aprendizado. Obrigada por ter me ajudado bastante desde o início ao fim deste trabalho, estando sempre presente, tirando minhas dúvidas, me aconselhando. Obrigada pela paciência, pela enorme dedicação e principalmente, pela amizade durante todo este período.

À toda equipe do laboratório de Imunologia de Tumores Sophia Sartori, Carolina Gorgulho, Juliana Frederico, Bianca Falasco, Marina Melo e Juliana Toscano, pelo apoio, atenção, ajuda e companhia durante o desenvolvimento deste trabalho. À equipe de funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Ana, Rafael e Aline sempre muito prestativos e dispostos a ajudar, obrigada pela atenção à mim dispensada.

Ao prof. Wellerson Rodrigo Scarano por ter cedido seu laboratório, por me ensinar, aconselhar e ajudar a obter melhores resultados nos meus experimentos. À Joyce Zalotti Brandt pelo suporte oferecido durante todo o tempo que passei neste laboratório.

À Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, por seus ensinamentos durante minha graduação na disciplina de Imunologia, é um prazer tê-la na comissão examinadora.

À equipe do hemocentro do Hospital Samaritano de São Paulo e aos doadores que forneceram o material sanguíneo necessário para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos para a viabilização deste trabalho.

RESUMO

HAMA R.S.S. Alterações fenotípicas em células dendríticas induzidas por exossomos alogênicos. **2014. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.**

Nanovesículas como os exossomos (Exo) resultam da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática e estão envolvidos na comunicação intercelular. Os Exo são uma atrativa ferramenta para aumentar a imunogenicidade de células dendríticas (DCs), uma vez que eles podem transferir antígenos tumorais para outras DCs para induzir a geração *in vivo* e *in vitro* de linfócitos T tumor-específicos. Sendo assim, hipotetizamos que DCs sensibilizadas com exossomos alogênicos (Exo-A2+) podem mudar seu fenótipo, assim como o dos Exo por elas secretados (Exo-Alo). Para tanto monócitos de doadores saudáveis HLA-A2+ foram diferenciados em DCs na presença de GM-CSF e IL-4 por sete dias. No sexto dia de cultura, as DCs foram pulsadas com o peptídeo PSA-1 e ativadas concomitantemente com IL-1, IL-6, TNF- α e PGE₂. O sobrenadante da cultura de DCs foi ultracentrifugado e filtrado para isolar os exossomos (Exo-A2+), que foram então utilizados para sensibilizar DCs de doadores saudáveis HLA-A2-. No quinto dia de diferenciação estas DCs (HLA-A2-) foram pulsadas com proteína PSA e após dezoito horas foram tratadas com Exo-A2+ (10 μ g/10⁶ DCs) e ativadas (IL-1, IL-6, TNF- α e PGE₂) por vinte e quatro horas. Análises fenotípicas por citometria de fluxo mostraram que as DCs tratadas com Exo-A2+ apresentaram maior número de células CD14+ que as DCs HLA-A2+. A análise da expressão das moléculas envolvidas com ativação linfocitária demonstrou que as DCs-Alo tratadas com Exo-A2+ apresentaram maior expressão da molécula CD86, no entanto, a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD83 apresentaram-se em menor densidade. Esses resultados parecem não ser apenas decorrente do tratamento com Exo alogênico, uma vez que as DCs A2- dos grupos controles apresentaram o mesmo perfil de resposta, indicando com isso que a diferença de haplótipos pode ter influenciado no fenótipo observado. Essa diminuição de expressão também refletiu nos exossomos liberados pelas DCs A2- (Exo-Alo), os quais apresentaram menor expressão de marcadores típicos de exossomos, como CD9, CD81 e CD63. Em conclusão, nossos resultados mostram que, o tratamento com Exo alogênico não conferiu aumento de imunogenicidade às DCs e nem aos exossomos por elas secretados, e que as diferenças de haplótipos entre os doadores parece interferir no curso dos fenômenos observados.

Palavras-chave: Célula dendrítica, exossomos, câncer de próstata e alogenicidade.

ABSTRACT

HAMA R.S.S. Phenotypic alterations induced by allogeneic exosomes on dendritic cells. **2014. Dissertation – Bioscience Institut of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.**

Nanovesicles such as exosomes (Exo) result from the fusion of multivesicular bodies with plasma membrane and are involved in the intercellular communication. It makes Exo an attracting tool for increasing the immunogenicity of dendritic cells (DCs), since they can transfer tumor antigens to other DCs to induce tumor-specific T lymphocytes. Therefore, we hypothesize that the sensitization of DCs with allogeneic Exo not only altered their phenotype, but also that of the Exo they secrete. Thus, monocytes of HLA-A2⁺ healthy donors were differentiated to DCs with GM-CSF and IL-4 for 7 days. At the 6th day, DCs were pulsed with PSA peptide, and IL-1, IL-6, TNF- α and PGE₂ were added to the culture. DC culture supernatant was ultracentrifuged and filtrated for the isolation of exosomes (Exo-A2⁺), which were used to sensitize DCs from HLA-A2⁻ healthy donors. At the 5th day of differentiation these DCs (HLA-A2⁻) were pulsed with prostate specific antigen (PSA) protein. After 18 hours, DCs were pulsed with Exo-A2⁺ (10 μ g/10⁶ DCs) and activated (IL-1, IL-6, TNF- α and PGE₂) for 24 h. Phenotypic analysis by flow cytometry showed that DCs treated with Exo-A2⁺ present high number of CD14⁺ cells than DCs HLA-A2⁺. Analysis of molecules involved with lymphocyte activation shows that DCs-Alo treated with Exo-A2⁺ present an increase expression of CD86 molecules, but, HLA-DR, CD80 and CD83 molecules expression were low. These results do not seem to be due to treatment with allogeneic Exo, since DCs A2⁻ of control groups presented the same profile of response, indicating that the haplotype difference may have influenced the phenotype changes. This decreased expression also reflected on exosomes from DC A2⁻ (Exo-Alo), which present low expression of typical exosomes markers, such as CD9, CD81 and CD63. In conclusion, our results show that the treatment with allogeneic Exo does not increase the immunogenicity of DCs or of their Exo, and that differences of among donors haplotype seems to influence the phenotypic changes.

Key words: Dendritic cells, exosomes, prostatic cancer and allogenicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO GERAL.....	15
2.1. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Delineamento experimental.....	16
3.2. Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs.....	16
3.3. Obtenção e quantificação dos exossomos.....	18
3.4. Fenotipagem de DCs.....	19
3.5. Caracterização dos Exo por citometria de fluxo utilizando microesferas paramagnéticas.....	20
3.6. Caracterização dos Exo e das DCs por Western blot.....	21
3.7. Comparação das fenotipagens das DCs e dos exossomos.....	22
3.8. Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Estratégia de análise fenotípica das DCs por citometria de fluxo.....	24
4.2. Análise fenotípica das DCs de doadores HLA-A2 ⁺ por citometria de fluxo	25
4.3. Estratégia de análise fenotípica dos exossomos por citometria de fluxo....	27
4.4. Análise fenotípica dos Exo de doadores HLA-A2 ⁺ por citometria de fluxo.	28
4.5. Análise fenotípica das DCs e dos Exo de doadores HLA-A2 ⁺ por Western blot.....	29
4.6. Efeito alogênico dos exossomos de doadores HLA-A2 ⁺ sobre o fenótipo das DCs de doadores HLA-A2 ⁻	30
4.7. Comparação de exossomos de doadores HLA-A2 ⁺ e de doadores HLA- A2 ⁻	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais frequente no Brasil e no mundo de acordo com a última estimativa divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2012). A quimioterapia, radioterapia ou a remoção cirúrgica do tumor (prostatectomia) são os tratamentos convencionais utilizados, contudo cerca de 30% dos pacientes apresentam recidivas e, em estágios avançados da doença, tais tratamentos revelam-se limitados (ROEHL et al., 2004).

Em 2010 concretizou-se uma nova alternativa ao tratamento com aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) da primeira vacina celular terapêutica para pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração (assintomáticos ou minimamente sintomáticos) (KANTOFF et al., 2010). Trata-se de uma suspensão celular rica em células apresentadoras de antígenos (APCs) do paciente, cultivadas de 36 a 44 horas com fosfatase ácida prostática (PAP) e com fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Os estudos clínicos mostram aumento de 4 meses da sobrevida global dos pacientes e redução relativa de 22% no risco de morte quando comparado com o grupo placebo (HIGANO et al, 2009; KANTOFF et al., 2010). Também foi observada a redução dos níveis de PSA (Antígeno Prostático Específico), principal marcador diagnóstico da doença (FREEDLAND et al., 2005). Esses dados demonstram a importância de uma abordagem imunoterapêutica no tratamento do câncer, como uma atrativa e promissora alternativa aos tratamentos convencionais.

Um dos principais objetivos da imunoterapia do câncer é a mobilização do sistema imunológico para geração de uma resposta linfocitária efetiva, sendo que as células dendríticas (DCs) são fundamentais nesse processo. Steinman e Cohn (1973) foram os principais responsáveis pela sistematização dos estudos sobre DCs,

as quais são derivadas da medula óssea e passam a residir em todos os tecidos. Essas células são APCs profissionais capazes de capturar, processar e apresentar eficientemente os antígenos de forma a induzir e modular respostas imunes, incluindo a imunidade antitumoral (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BANCHEREAU, 2000; BANCHEREAU; PALUCKA, 2005, 2012).

Fisiologicamente, as DCs apresentam-se normalmente imaturas (iDCs) do tecido periférico e possuem habilidade de capturar antígenos eficientemente; contudo sua capacidade de secretar citocinas é limitada e expressam baixos níveis de moléculas coestimuladoras (GUERMONPREZ et al., 2002). Na presença de estímulos pró-inflamatórios e "sinais de perigo" do microambiente, as DCs diferenciam-se em DCs maduras (mDCs) que podem iniciar respostas imunes de modo eficiente (GUERMONPREZ et al., 2002). A maturação está associada ao aumento da expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 na superfície celular (BANCHEREAU et al., 2000). Também está associada à habilidade de secretar citocinas inflamatórias e à expressão de receptores para quimiocinas, como o CCR7, que dirige a migração das DCs para os linfonodos (CAUX et al., 1994; YANAGIHARA et al., 1998; BANCHEREAU et al., 2000; ARINA et al., 2002; GUERMONPREZ et al., 2002). A expressão da molécula CD40 também é um sinal essencial para a maturação das DCs que tornam-se aptas a iniciar a imunidade adaptativa através da interação com linfócitos T *náive* em órgãos linfóides secundários (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Quando interagem com DCs, linfócitos T *náive* CD4⁺ e CD8⁺ podem diferenciar-se em células específicas com diferentes funções, originando linfócitos T citotóxicos efetores (CTLs, CD8⁺), células T *helper* 1 (Th1), T *helper* 2 (Th2), T

helper 17 (Th17), células T *helper* foliculares (que auxiliam as células B a diferenciar-se em células secretoras de anticorpos), ou ainda células T reguladoras (Treg), que regulam a função de outros linfócitos e mesmo das DCs (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998, 2007). Essas propriedades especiais das DCs em coordenar respostas inatas e adaptativas do sistema imune, fazem delas as principais candidatas na vacinação terapêutica contra o câncer. Entretanto, para que uma imunoterapia seja efetiva é necessária a coleta de uma quantidade suficiente de DCs, as quais se apresentam em baixo número no sangue periférico (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994; SHURIN; SALTER, 2009). Diante desse impasse, a indução da diferenciação de DCs *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico tem possibilitado a geração de um número considerável de DCs humanas (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994), o que ampliou consideravelmente o uso dessas células na geração de vacinas antitumorais.

Neste sentido, diferentes protocolos de sensibilização das DCs têm sido propostos, desde a simples exposição a lisado de células tumorais até métodos mais elaborados como a fusão celular ou transferência com genes diversos. Um exemplo é a utilização da própria célula tumoral do paciente como fonte ampla de antígenos tumorais. Nesse sentido, foi demonstrado que iDCs de pacientes com carcinoma de ovário, geradas a partir de monócitos, foram fundidas com as células tumorais provenientes do paciente, produzindo um heterocário que expressa tanto as moléculas envolvidas na ativação linfocitária, como antígenos tumorais, gerando *in vitro*, linfócitos T citotóxicos tumor-específicos (GONG et al., 2000). Em teste clínico subsequente desenvolvido pelo grupo com pacientes de câncer de mama e renal metastáticos (AVIGAN et al., 2004), os pacientes foram tratados com DCs autólogas fundidas com células tumorais do próprio indivíduo. Após a vacinação, os linfócitos

foram desafiados *in vitro* com antígenos tumorais e observou-se aumento da frequência tanto de células $CD4^+$ quanto de $CD8^+$ produtoras de IFN- γ (aproximadamente 55% e 40% dos pacientes avaliados, respectivamente). De modo geral, a vacina não foi tóxica e levou a estabilização da doença em aproximadamente 18% dos pacientes.

Apesar de promissores, esses resultados não são definitivos e abrangentes para todos os pacientes tratados, principalmente nos protocolos em que se usam DCs autólogas. Talvez uma das limitações seja o uso das DCs dos próprios pacientes, principalmente se forem utilizadas células com fenótipo imaturo, o que favoreceria um estado de regulação mais do que de ativação. De fato, foi demonstrado que iDCs de pacientes com câncer de mama, geradas *in vitro* a partir de monócitos, induziram diferenciação preferencial de linfócitos Treg FOXP3 $^+$ que as iDCs de doadores saudáveis, bem como maior produção da IL-10 e do fator de crescimento transformador - beta", TGF- β (RAMOS et al., 2012), supressores característicos da resposta imune.

Sendo assim é necessária a pesquisa de novas abordagens para melhorar a imunogenicidade das DCs dos pacientes com câncer. Nesse sentido, uma estratégia atrativa para aumentar a imunogenicidade das DCs é o uso de nanovesículas chamadas exossomos (Exo), que foram descritas pela primeira vez há mais de vinte anos por dois grupos que estudavam a maturação de reticulócitos (HARDING et al., 1983; PAN et al., 1985). Os Exo são pequenas vesículas membranosas que se formam no interior de corpos multivesiculares (*Multivesicular Bodies*, MVB), provenientes de endossoma tardio e são liberados no meio extracelular através da fusão da membrana dos MVB com a membrana plasmática (RAPOSO et al., 1996; THÉRY et al., 2002). São caracterizados pelo seu pequeno diâmetro (50 a 100 nm)

e secretados por vários tipos celulares incluindo várias linhagens de células tumorais e células do sistema imune (RAPOSO et al., 1996; ZITVOGEL et al., 1998; SKOKOS et al., 2001; WOLFERS et al., 2001; ZAKHAROVA et al., 2007). Os Exo possuem diversas proteínas celulares comuns às vesículas de qualquer tipo celular e outras células-específicas (SIMPSON et al., 2008; MATHIVANAN; SIMPSON, 2009; THÉRY et al., 2009).

Tudo indica que os Exo contribuem para a comunicação intercelular do organismo, podendo interagir com diversos tipos celulares (LUDWIG; GIEBEL, 2012), visto que sua membrana carrega diversas moléculas de adesão, que podem favorecer sua captura por células receptoras. Um exemplo dessa interação foi demonstrada entre a molécula ICAM-I dos Exo secretados por mDCs e a molécula LFA-1, expressa em linfócitos T ativados, favorecendo a transferência de moléculas do MHC de classe II dos Exo para os linfócitos (NOLTE-'T HOEN et al., 2009). Outro estudo demonstrou que Exo de DCs também possuem receptores *Toll-like* (TLR) em sua superfície, como por exemplo, o TLR-4, podendo assim reconhecer e ligar-se a lipopolissacarídeos (LPS) de parede de bactérias e induzir aumento na expressão de TNF- α nas DCs vizinhas. Além disso, estas DCs tratadas com Exo-LPS aumentam sua interação com células *Natural Killer* (NK), as quais aumentam a secreção de IFN- γ (SOBO-VUJANOVIC et al., 2014). Exo também podem ser capturados pela linhagem de monócitos, THP-1, através dos TLR-2 e TLAR-4, levando a ativação dos fatores de transcrição NF κ B e STAT3 e a liberação de citocinas (BRETZ et al., 2013) . Sua captura também é favorecida pela presença de fosfatidilserina (THÉRY et al., 2002), em sua superfície, reconhecida por fagócitos (CHAPUT; THÉRY, 2011). Outras moléculas como a Tim1 e Tim4, recentemente descritas na captura de células apoptóticas por fibroblastos (MIYANISHI et al., 2007), também são

expressas na superfície de fagócitos e linfócitos, sugerindo uma possível interação destas moléculas com a fosfatidilserina dos Exo.

Além da transferência de informações entre células via Exo, essas nanovesículas têm chamado a atenção da comunidade científica devido a sua capacidade de aumentar a resposta imune antitumoral (ZITVOGEL et al., 1998; CHAPUT et al., 2004; VIAUD et al., 2010). Um dos primeiros estudos realizados nessa linha foi desenvolvido pelos grupos franceses do *Institut Gustave Roussy* e *Institut Curie*, em que vacinas contendo Exo derivados de DCs foram usadas no tratamento de pacientes com melanoma metastático. A terapia foi bem tolerada sem qualquer grau de toxicidade, sendo que 2 pacientes apresentaram estabilização da doença (CHAPUT et al., 2005). Além disso, foi observado aumento do número de células NKs nos pacientes, com aumento de atividade citotóxica e produção de IFN- γ *in vitro*.

Como a iniciação de respostas imunes requer a apresentação por APCs de peptídeos antigênicos associados a moléculas de MHC classe I e II, os Exo possuem a capacidade de carregar e transferir os complexos MHC/peptídeos antigênicos a outras células, o que pode vir a contribuir com a geração de uma resposta imune mais eficiente. De fato, observamos previamente que Exo derivados de DCs humanas podem ser incorporados, *in vitro*, por células de carcinoma mamário humano, SK-BR3, as quais passaram a expressar moléculas envolvidas na ativação de linfócitos, como HLA-DR e CD86 (ROMAGNOLI et al., 2013). Também observamos que o tratamento de monócitos com IL-4, GM-CSF e Exo derivados de mDCs foi capaz de induzir fenótipo similar ao de células dendríticas maduras com expressão mais intensa das moléculas HLA-DR, CD80, CD86, que no grupo ativado diretamente com TNF- α (ROMAGNOLI et al., 2012). Além disso, Exo derivados de

DCs podem também induzir a ativação direta de linfócitos T citotóxicos, pelo carregamento do complexo funcional MHC-I/peptídeo tumoral, o que *in vivo* levou a rejeição de tumores pré-estabelecidos em camundongos (ZITVOGEL et al., 1998). Exo derivados de DCs também podem *in vivo* amplificar a resposta imune, por transferência de complexos MHC/peptídeo a outras DCs que ainda não tenham entrado em contato com o antígeno (HAO et al., 2006).

Sendo assim, **Exo derivados de DCs de doadores saudáveis poderiam ser usados no direcionamento de antígenos tumorais, de modo que a exposição de DCs de pacientes aos Exo de DCs alogênicas de doadores saudáveis, sensibilizadas com peptídeo tumoral, poderia proporcionar aumento de sua imunogenicidade.**

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento de DCs com Exo alogênico modifica o fenótipo dessas células, as quais apresentariam aumento de moléculas envolvidas na ativação linfocitária. Além disso, avaliamos também se estas alterações fenotípicas estão presentes nos exossomos secretados pelas DCs tratadas com Exo alogênico.

2. OBJETIVO GERAL

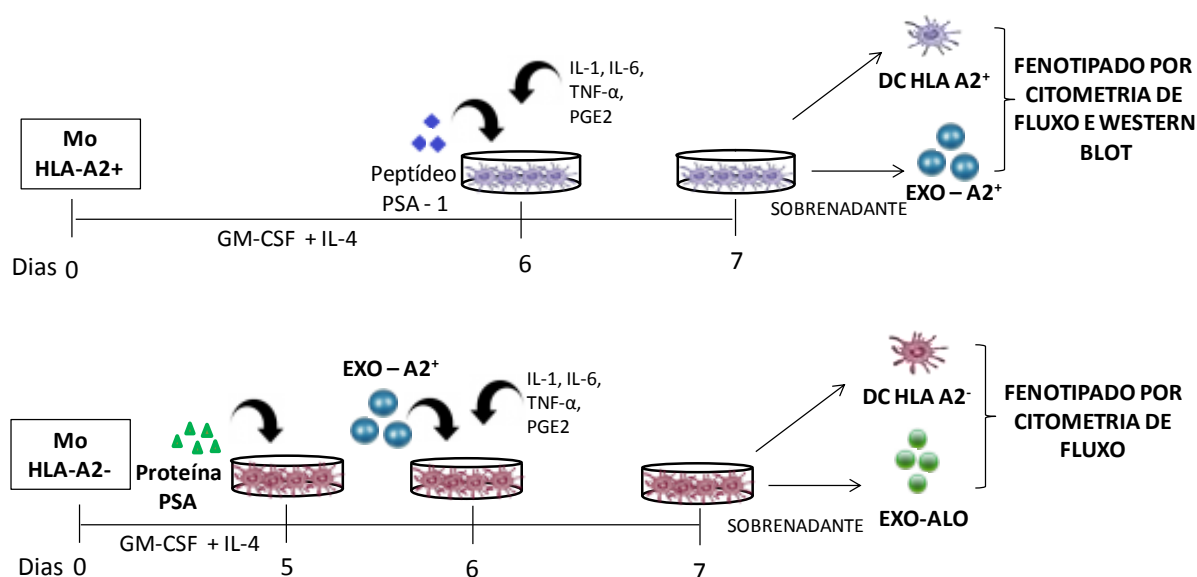
Avaliar se os exossomos liberados pelas DCs tratadas com Exo alogênico apresentam aumento de expressão de moléculas envolvidas na ativação linfocitária.

2.1 Objetivos específicos

- Obtenção de Exo das DCs de doador HLA-A2⁺ (Exo alogênico) e avaliação fenotípica por citometria de fluxo e *Western blot*;
- Isolamento e caracterização fenotípica dos Exo de DCs HLA-A2⁻, sensibilizadas com Exo alogênico, por citometria de fluxo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental



3.2. Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs

As amostras de sangue necessárias para a diferenciação de DCs e obtenção dos exossomos neste estudo foram obtidas a partir de câmaras de leucorredução de plaquetaferese de doadores saudáveis. As amostras foram obtidas junto à Unidade de Hemoterapia e Hematologia Samaritano (UHHS) do Hospital Samaritano, São Paulo-SP, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, parecer 625.858. A fenotipagem HLA-A2 dos doadores foi providenciada pela equipe da UHHS. Abaixo identificação dos doadores participantes e a descrição dos haplótipos (quadro 1).

Quadro 1. Descrição dos haplótipos dos doadores HLA-A

Identificação no Experimento	Haplótipos dos doadores HLA-A2 ⁺
1	HLA-A* 02/23
2	HLA-A* 02/03
3	HLA-A* 02/23
4	HLA-A* 02/02
	Haplótipos dos doadores HLA-A2⁻
A	HLA-A* 24/68
B	HLA-A* 01/68
C	HLA-A* 01/24
D	HLA-A* 23/30
E	HLA-A* 30/68

Para obtenção de exossomos de doadores HLA-A2⁺, DCs foram diferenciadas a partir de população enriquecida de CD14⁺, como previamente descrito (ROMAGNOLI, 2012). Assim, DCs de doadores saudáveis HLA-A2⁺ (**DC A2⁺**) foram obtidas por diferenciação de células CD14⁺ selecionadas, as quais foram cultivadas em meio livre de soro, na presença de GM-CSF e IL-4 (50ng/mL). Após 6 dias de cultura, as DCs foram pulsadas com peptídeo prostático PSA (PSA-1 sequência FLTPKKLQCV, restrito ao HLA-A2, 10µg/mL) e estimuladas, por 24 horas, pela adição de coquetel de ativação (10 ng/mL de TNF-α, 10 ng/mL de IL1-β, 10ng/mL de IL-6 e 1 µg/mL de prostaglandina E2). Os exossomos (Exo-A2⁺) foram isolados por ultracentrifugação a partir do sobrenadante desta cultura, os quais foram posteriormente utilizados para sensibilização das DCs.

Para as análises do efeito do tratamento com Exo-A2⁺, DCs de doadores saudáveis (HLA-A2⁻), aqui denominadas **DC A1o**, foram diferenciadas em meio com 5% de soro humano AB em presença de GM-CSF e IL-4 (50ng/mL). Após 5 dias de cultura, adicionamos a proteína humana PSA (antígeno prostático específico, 10µg/10⁶ DCs), obtida a partir de sêmen com 70% de pureza (fornecedor). Foi utilizada a proteína (e não o peptídeo PSA-1) neste momento, objetivando em ensaio futuros a estimulação de linfócitos T CD4⁺. Decorridas 18 horas de incubação, as DCs foram pulsadas com Exo alogênicos carregados com peptídeo

PSA-1 (Exo-A2⁺) e estimuladas com coquetel de ativação, como mencionado acima. Após 24 horas, as DCs foram coletas, seguindo-se análise fenotípica por citometria de fluxo e obtenção de exossomos (Exo-Alo).

3.3. Obtenção e Quantificação dos Exossomos

Os exossomos foram isolados como previamente publicado (ROMAGNOLI et al., 2013). Resumidamente, os sobrenadantes de culturas de DCs foram submetidos a 3 diferentes e sucessivas centrifugações, 300xg por 5 minutos, para remoção das células, 1.200 g por 20 minutos e 10.000xg por 30 minutos para remoção dos “*debris*” celulares. Então, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000xg por 2 horas em rotor de ângulo fixo. O *pellet* obtido desta primeira ultracentrifugação foi ressuspenso em PBS e novamente ultracentrifugado a 100.000xg por 2 horas para obtenção do *pellet* contendo exossomos. A quantificação de proteínas obtidas do *pellet* recuperado foi pelo *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce). Após quantificação, o material foi aliquotado e devidamente identificado para estocagem a -80° C. Os Exo obtidos de células dendríticas (HLA-A2⁺) pulsadas com peptídeos PSA-1 foram denominados **Exo-A2⁺** e os obtidos das DCs pulsadas com Exo-A2⁺, foram denominados **Exo-Alo**. Como controles foram obtidos exossomos das DCs A2⁻ somente ativadas (**Exo-Ctrl**); exossomos de DCs A2⁻ sensibilizadas apenas com proteína PSA e ativadas (**Exo-PSA**); exossomos obtidos de DCs A2⁻ sensibilizadas apenas com o Exo-A2⁺ e ativadas (**Exo**).

Devido à inserção dos grupos controles, as denominações utilizadas para os exossomos no projeto inicial foram alteradas. Exo obtidos de doadores HLA-A2⁺ antes denominados **Exo-Alo** passaram para **Exo-A2⁺** e os obtidos de doadores HLA-A2⁻ antes denominados **Exo** passaram para **Exo-Alo**.

3.4. Fenotipagem de DCs

Cerca de 1×10^5 DCs foram adicionadas em um tubo cônico de 1,5mL e centrifugadas por 10 segundos a 10000rpm, a 4° C. Anticorpos específicos para os marcadores de interesse foram adicionados em concentração apropriada e os tubos incubados por 20 minutos a 4° C, ao abrigo de luz. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados novamente e cada tubo foi lavado três vezes com 200µL de tampão para citometria (PBS, contendo 0,5% de BSA). Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 300µL de tampão para citometria e adquiridas no citômetro *FACSCanto™ II* (BD Biosciences) com *software FACSDiva* (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no *software FlowJo*, versão vX.10.6 (Tree Stars Inc.). As moléculas analisadas foram: CD1a (envolvida na apresentação de antígenos não peptídeos), CD40 (marcador de ativação de DCs), CD14 (expressa por monócitos-macrófagos, está ausente ou tem baixa expressão em DCs), CD11c (envolvida na adesão do monócito ao endotélio e a proteínas da matriz extracelular), CD86 (molécula de coestímulo), HLA-DR (molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe II), CD83 (marcador de DCs maduras), CD80 (molécula de coestímulo), HLA-ABC (molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe I), PD-L1 (envolvida na inibição da ativação de células T) e 7AAD (marcador utilizado para análise de viabilidade celular). A tabela 1 é referente às especificações dos anticorpos monoclonais utilizados.

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

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo
CD1a	HI149	IgG1, k	FITC
CD40	5C3	IgG1, k	PE
CD14	M5E2	IgG2a, k	PE-Cy7
CD11c	B-ly6	IgG1, k	APC
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, k	FITC
CD83	HB15e	IgG1, k	PE-Cy7
CD80	L307.4	IgG1, k	APC-H7
HLA-DR	G46-6	IgG2a, k	PE

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

3.5. Caracterização dos Exo por citometria de fluxo utilizando microesferas paramagnéticas.

A expressão de marcadores de superfície nos Exo foi determinada por citometria de fluxo de modo similar ao descrito (LÄSSER et al., 2011, 2012). Brevemente, 40µg de Exo foram incubados com microesferas paramagnéticas de 4,5 µm (*Dynabeads M450*), previamente recobertas com anticorpos anti-HLA-DP, DQ, DR (*Dynabeads® HLA Cell Prep™ II, Invitrogen Dynal AS*), overnight, à 4°C. Este acoplamento foi realizado para possibilitar a detecção das nanovesículas no citômetro de fluxo. Após este período, as microesferas acopladas aos Exo foram incubadas em PBS-BSA 2%, por 15 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após lavagens, a expressão das diferentes moléculas de superfície dos Exo foi avaliada através de marcação simples para os anticorpos marcados contra: CD86, CD63, CD81 e CD9 sob agitação por 40 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este período, as nanovesículas foram avaliadas no citômetro *FACSCanto™ II* (BD Biosciences) com *software FACSDiva* (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no *software FlowJo*, versão vX.10.6 (*Tree Stars Inc.*). As especificações dos anticorpos monoclonais utilizados estão na tabela 2.

Tabela 2 - Dados referentes aos anticorpos murinos anti-humano usados para citometria de fluxo

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, κ	FITC
CD86*	IT2.2	IgG1, κ	APC
CD9	M-L13	IgG1, κ	FITC
CD81	JS-81	IgG1, κ	PE
CD63	H5C6	IgG1, κ	PE

Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo, utilizados para fenotipagem de monócitos e células dendríticas. *Anticorpo adquirido da Biolegend, os demais anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

3.6. Caracterização dos Exo e das DCs por Western blot

Os fenótipos dos exossomos e das DCs foram confirmados pela técnica de *Western blot*. Esta técnica foi desenvolvida sob supervisão do prof. Wellerson Rodrigo Scarano do Departamento de Morfologia do IBB da UNESP. Para tal, as proteínas das DCs e dos exossomos foram extraídas utilizando tampão RIPA, adicionado ao coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, MI, USA). As DCs e os Exo foram transferidos para um tubo cônico de 1,5mL e mantidos no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram homogeneizados em agitador de tubos e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos, a 4° C, e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi realizada pelo *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce). As alíquotas (30µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (*Laemli sample buffer – Bio-rad*) e β-mercaptoetanol a 95°C por 1 minuto. Em seguida, as proteínas foram separadas em SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em BSA 5% ou com leite desnatado (1 - 5%) em tampão Tris-HCl (TBS) por 30 a 60 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com os anticorpos primários: anti-CD63, anti-CD86, anti-Hsc70 e anti-HLA-DR adquiridos da *Abcam* (*Abcam Inc., Cambridge, MA, USA*); β-actina (SC47778): adquiridos da Santa Cruz

Biotechnology, USA; em BSA 3% diluído em Tris-HCl ou em leite (1 - 5%), ou em Tris-HCl contendo 0,2% de *Tween* 20 por 2 horas ou *overnight*. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído em BSA 3%, leite 1% a 5% ou Tris-HCl contendo 0,2% de *Tween* 20 (TBST) por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente (*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate*) adquirido da *Thermo Scientific®* (Rockford, IL, USA) e a densidade óptica de cada banda foi avaliada pelo software *ImageJ®* 1.47 para *Windows*, e normalizada pela densidade da β -actina e, posteriormente comparada entre os exossomos ou as células.

3.7. Comparação da fenotipagem das DCs e dos Exossomos

Para saber se o tratamento com Exo-A2⁺ aumentou a expressão de moléculas envolvidas na ativação linfocitária nas DCs A2⁻, foi realizada análise comparativa dos fenótipos observados: nas DCs alogênicas dos doadores HLA-A2⁺ (**DC A2⁺**); nas DCs de doadores HLA-A2⁻ somente ativadas (**DC Ctrl**); DCs de doadores HLA-A2⁻ sensibilizadas apenas com a proteína PSA e ativadas (**DC PSA**); nas DCs HLA-A2⁻ sensibilizadas apenas com o Exo-A2⁺ e ativadas (**DC + Exo**) e nas DCs HLA-A2⁻ sensibilizadas com a proteína PSA e com Exo-A2⁺ e ativadas (**DC Alo**).

Esta análise comparativa também foi realizada entre os exossomos obtidos das DCs dos doadores HLA-A2⁺ (**Exo-A2⁺**) e dos doadores HLA-A2⁻: nos exossomos obtidos das DCs somente ativadas (**Exo-Ctrl**); exossomos de DCs sensibilizadas apenas com proteína PSA (**Exo-PSA**); exossomos obtidos de DCs sensibilizadas apenas com o Exo-A2⁺ (**Exo**) e por fim, exossomos de DCs sensibilizados com proteína PSA e Exo-A2⁺ (**Exo-Alo**). Todas as DCs foram

cultivadas em meio livre de soro, na presença de GM-CSF e IL-4 durante 6 dias e estimuladas, por 24 horas, pela adição de coquetel de ativação (10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL1- β , 10ng/mL de IL-6 e 1 μ g/mL de prostaglandina E2).

3.8. Análises Estatísticas

Os dados obtidos quanto à fenotipagem das células dentríticas dos doadores HLA-A2⁺ e HLA-A2⁻ e de seus exossomos foram inicialmente analisados quanto a homogeneidade da variância, utilizando-se o Teste de *Fisher*, seguido da análise pelo teste de t de *Student*, caso apresentassem homocedasticidade, ou o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Os resultados de imunofenotipagem das DCs dos diferentes grupos dos doadores HLA-A2⁻ e de seus exossomos foram analisados quanto a homogeneidade da variância, utilizando-se o Teste de *Bartlett*. Somente após este teste, as amostras foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer*, caso apresentassem homocedasticidade. Caso contrário, o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn* foi usado. Os resultados cuja distribuição não foi normal foram expressos pela mediana. Todos os testes neste trabalho foram realizados considerando o nível de significância de $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Estratégia de análise fenotípica das DCs por citometria de fluxo.

Para uma análise mais refinada do fenótipo das DCs geradas neste projeto, delineamos estratégia de *gates* demonstrada na Figura 1. Inicialmente, baseado nos parâmetros tamanho em área (FSC-A) por tamanho em altura (FSC-H) construímos o *gate singlets*, objetivando a análise de apenas uma célula por vez (Figura 1A). Dentro do *gate singlets*, delineamos novo *gate* baseado no tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) esperados para as DCs (Figura 1B), as quais estão localizadas na região de células grandes e mais granulosas. Dentro do *gate* DC construímos novo *gate*, baseado na viabilidade das células (Figura 1C). Para tal, utilizamos o marcador 7AAD, para exclusão das células mortas, de modo que todas as demais análises foram realizadas nas células que eram 7AAD negativas. Por fim, delineamos novo *gate* em que selecionamos apenas células CD11c⁺, correspondentes às mielóides (Figura 1D), entre as quais (99%) foram analisadas as moléculas CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, CD40 e HLA-DR.

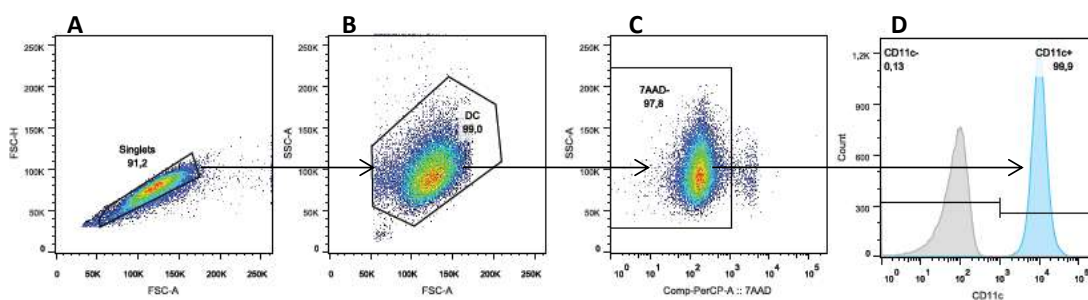


Figura 1 – Estratégia geral de análise fenotípica das mDCs por citometria de fluxo. Células CD14⁺ foram tratadas com GM-CSF e IL-4 para geração de células dendríticas, as quais no 6º dia de cultura foram ativadas com IL-1, IL-6, TNF- α e PGE-2. Pseudocolor e histograma demonstrando os *gates* de análise da população de mDCs. (A) O *gate singlets* foi baseado na análise singular das células. (B) O *gate* DC de análise foi baseado no tamanho e granulosidade da população em questão. (C) O *gate* 7AAD⁻ representa as células viáveis analisadas. (D) Histograma demonstrando o *gate* CD11c⁺, onde as células eram positivas para este marcador e no qual as demais moléculas de superfície foram analisadas. O histograma em cinza marca o isotipo controle e o histograma em azul, representa as células que expressam a molécula CD11c.

4.2. Análise fenotípica das DCs de doadores HLA-A2⁺ por citometria de fluxo

As células dendríticas de 4 doadores HLA-A2⁺ saudáveis tratadas com peptídeo PSA e concomitantemente ativadas com coquetel de ativação (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE-2) estão ilustradas na Figura 2. Observamos inicialmente que as DCs geradas dos 4 doadores apresentaram uma viabilidade aproximada de 95%, resultado este que sustenta a obtenção de uma fração de exossomos pura, com redução da presença de corpúsculos apoptóticos. Observamos que 15% das DCs dos doadores 2 e 3 expressaram CD1a e apenas 5% e 7% as do doador 1 e 4, respectivamente. As DCs dos doadores 1, 3 e 4 apresentaram maior expressão da molécula CD14, que a do doador 2.

Em relação às moléculas envolvidas na ativação linfocitária, observamos elevada frequência de DCs positivas para HLA-DR, CD86 e CD83 (Figura 3). As DCs dos doadores 2 e 3 apresentaram maior frequência de células CD80⁺ (~98%), que a do doador 1 (72%) e 4 (69%). Já as DCs CD40⁺ tiveram alta frequência apenas no doador 2. Devido a um problema com o anticorpo, a molécula CD40 não pôde ser avaliada no doador 4.

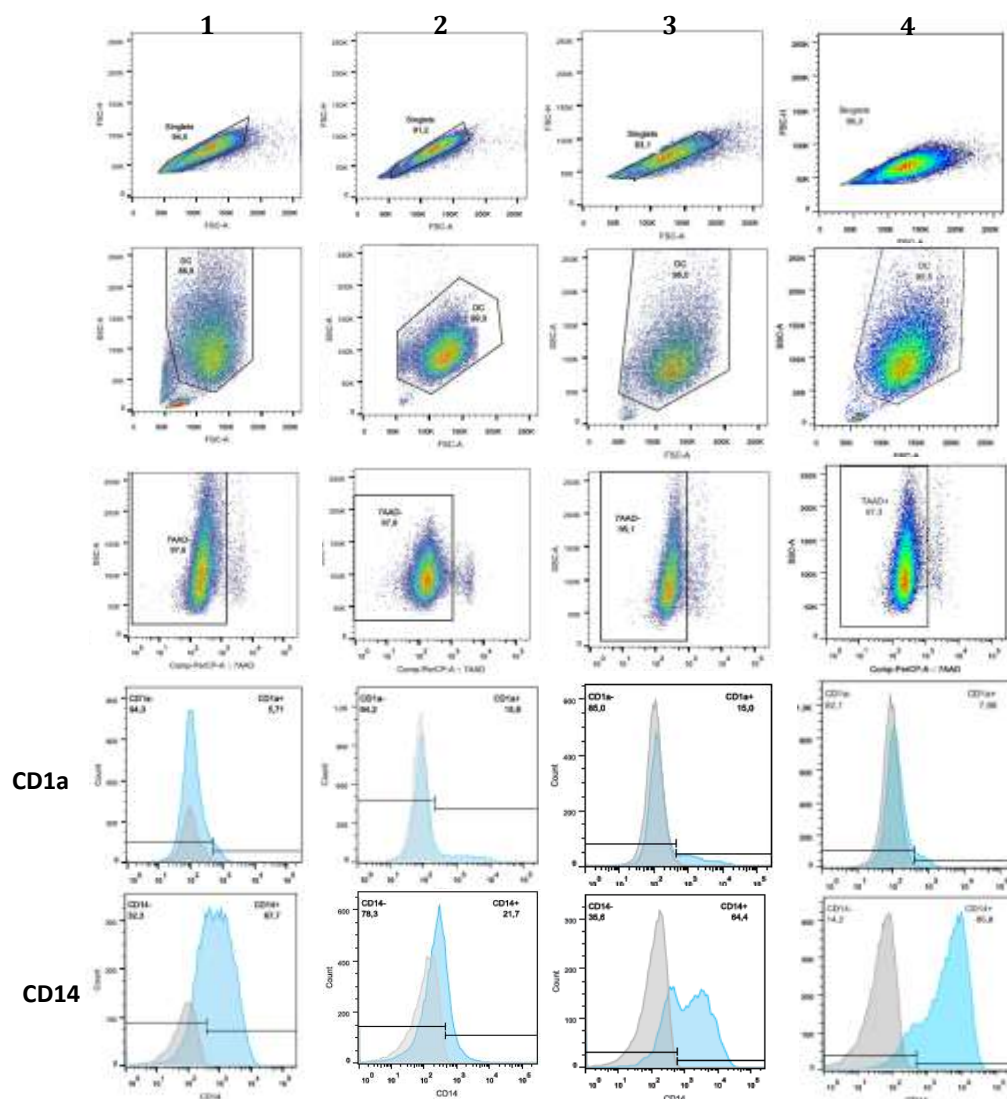


Figura 2. Imunofenotipagem das DCs de doadores HLA-A2⁺. Monócitos de 4 doadores saudáveis foram tratados com GM-CSF e IL-4 para geração de células dendríticas, as quais no 6^o dia de cultura foram ativadas com IL-1, IL-6, TNF- α e PGE-2 e tratadas com peptídeos PSA, por 24 horas. Na primeira linha, gráficos mostrando o *gate singlets* dos 4 doadores, respectivamente. Segunda linha, tamanho e granulosidade das DCs geradas. Terceira linha, demonstração da viabilidade celular das DCs, através da exclusão por 7AAD. Por fim, análise em histograma das moléculas CD1a e CD14. O histograma cinza representa o controle isotípico e o azul as células que foram marcadas com anticorpo monoclonal específico.

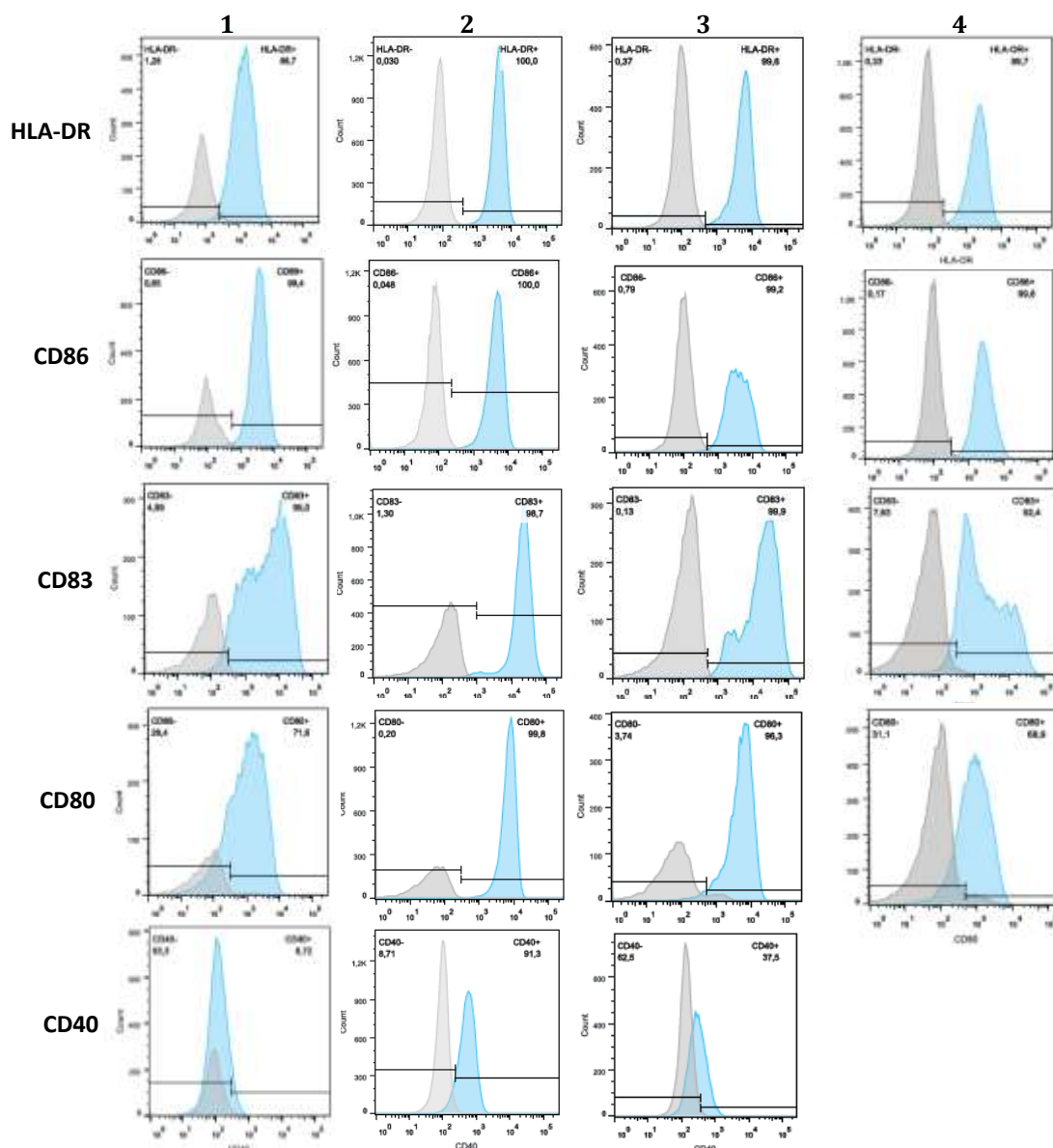


Figura 3. Análise dos marcadores de ativação nas DCs de doadores HLA-A2⁺. Monócitos de 4 doadores saudáveis foram tratados com GM-CSF e IL-4 para geração de células dendríticas, as quais no 6^o dia de cultura foram ativadas com IL-1, IL-6, TNF- α e PGE-2 e tratadas com peptídeos PSA, por 24 horas. Análise em histograma das moléculas envolvidas na ativação linfocitária. O histograma cinza representa o controle isotípico e o azul as células que foram marcadas com anticorpo monoclonal específico.

4.3. Estratégia de análise fenotípica dos exossomos por citometria de fluxo.

Para todas as análises deste projeto quarenta microgramas de Exo foram adicionados a 10^5 microesferas paramagnéticas, para fenotipagem de cada marcador de superfície avaliado. Após acoplamento, realizamos as análises em citômetro de fluxo. A figura 2 à esquerda mostra o *gate R1* definido por FSC e SSC,

no qual todas as análises foram realizadas (contem as microesferas isoladas). O *gate* R2 refere-se aos agregados de 2 microesferas e o *gate* R3 aos agregados de 3 microesferas, excluídos da análise.

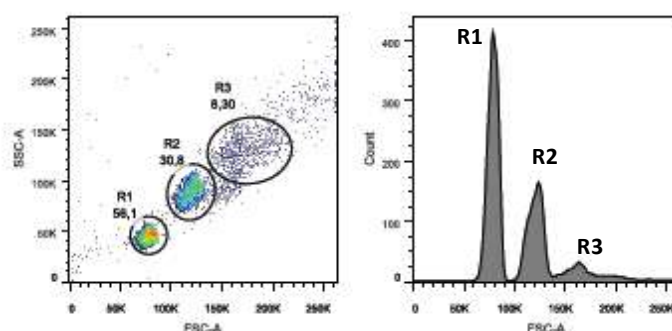


Figura 4. Estratégia de análise dos exossomos por citometria de fluxo. Exossomos obtidos de mDCs (40 μ g) foram acoplados por 24 horas com microesferas paramagnéticas (Dynabeads M-450) para análise de alguns marcadores de superfície, por citometria de fluxo. À esquerda, Pseudocolor e a direita, Histograma representando as microesferas acopladas com Exo. As microesferas podem ser determinadas baseando-se nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), apresentando-se uma única vez (R1), duplamente acopladas (R2) e triplamente acopladas (R3). O *gate* R1 foi utilizado para todas as análises.

4.4. Análise fenotípica dos Exo de doadores HLA-A2⁺ por citometria de fluxo

Como pode ser verificado na Figura 5, todos os Exo de doadores HLA-A2⁺ analisados expressavam marcadores característicos de Exo, como as tetraspaninas, além da molécula CD86, que é característica de nanovesículas liberadas das DCs. Subtende-se que os Exo também expressavam HLA-DR, uma vez que está foi uma das moléculas utilizadas como âncora para acoplamento com as microesferas paramagnéticas. De modo geral os Exo-A2⁺ dos doadores 2 e 3 expressavam mais tetraspaninas do que os doadores 1 e 4.

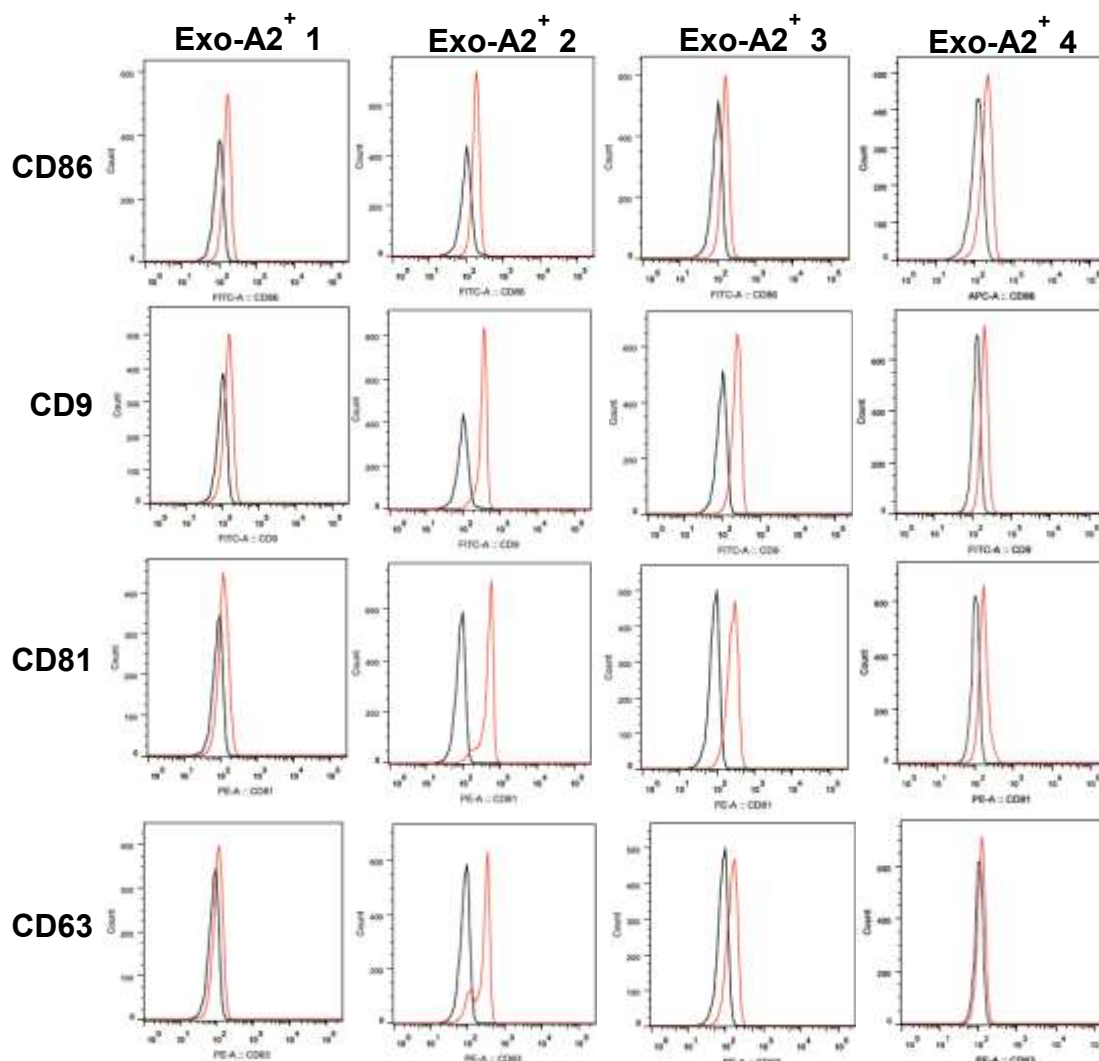


Figura 5. Imunofenotipagem dos Exo-A2⁺, originados de DCs de doadores HLA-A2⁺. Os Exo obtidos de 4 doadores HLA-A2⁺ foram acoplados com microesferas paramagnéticas, *Dynabeads M-450*, e analisados por citometria de fluxo. Histogramas mostrando positividade para a molécula CD86, CD9, CD63 e CD81. Nos histogramas a linha vermelha representa a marcação específica e a linha preta a marcação com o isotipo controle IgG1k.

4.5. Análise fenotípica de DCs e Exos de doadores HLA-A2⁺ por Western Blot

Para confirmação de que o material obtido por ultracentrifugação continha nanovesículas com características de exossomos, realizamos a fenotipagem também pela técnica de *western blot*. Verificamos que os exossomos de três doadores HLA-A2⁺ apresentaram HLA-DR, marcador característicos de Exo de DCs (Figura 6). A molécula CD86 foi detectada nos Exo de dois doadores (2 e 4), assim como a molécula HSC-70 (2 e 3). De modo geral, conseguimos detectar a presença

de pelo menos duas moléculas características em cada material obtido. As DCs foram também utilizadas como controle de marcação e observamos que os exossomos carregam uma grande quantidade de moléculas envolvidas na ativação linfocitária (HLA-DR e CD86) com similar intensidade às suas células de origem. Os exossomos obtidos do doador 1 não foram fenotipados por esta técnica devido ao baixo rendimento de proteína exossomal obtido, sendo apenas fenotipados por citometria de fluxo (Figura 5).

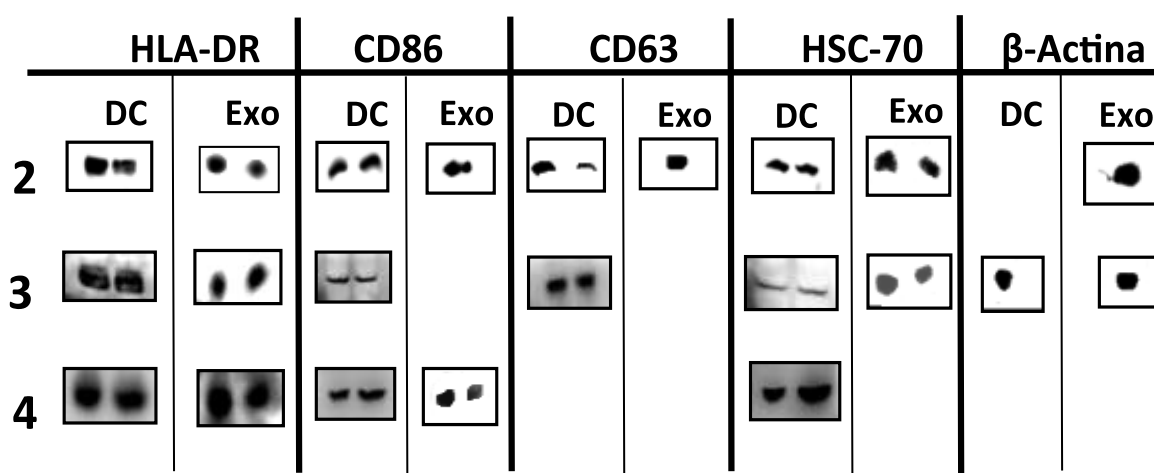


Figura 6. Análise Imunofenotípica dos Exossomos e das DCs por Western Blot. 30 µg de proteínas originadas de Exossomos e de DCs de 3 doadores HLA-A2⁺ (2,3,4) foram separadas em SDS-PAGE. Após transferência para membrana, as mesmas foram avaliadas quanto à presença das moléculas HLA-DR, CD86, CD63, HSC-70 e β-actina, utilizada como controle positivo. Com exceção da β-actina e Exo CD63, as demais moléculas foram representadas em duplicata.

4.6. Efeito alogênico dos exossomos de doadores HLA-A2⁺ sobre o fenótipo das DCs de doadores HLA-A2⁻.

Para melhor compreensão do efeito do tratamento de exossomos alogênicos sobre o fenótipo das DCs A2⁻, resolvemos apresentar os resultados em comparação com os obtidos dos doadores A2⁺. A figura 7 é representativa de um experimento e nela podemos verificar que o tratamento com Exo-A2⁺ parece interferir na diferenciação das DCs, levando a diminuição da expressão de CD1a nas DCs A2⁻ (aqui denominadas de **DC Alo**), bem como ao aumento da frequência de células CD14⁺. Quanto às moléculas envolvidas na apresentação linfocitária, HLA-DR,

CD80 e CD83 houve decaimento da expressão deste marcador nas DC Alo, após tratamento com Exo-A2⁺.

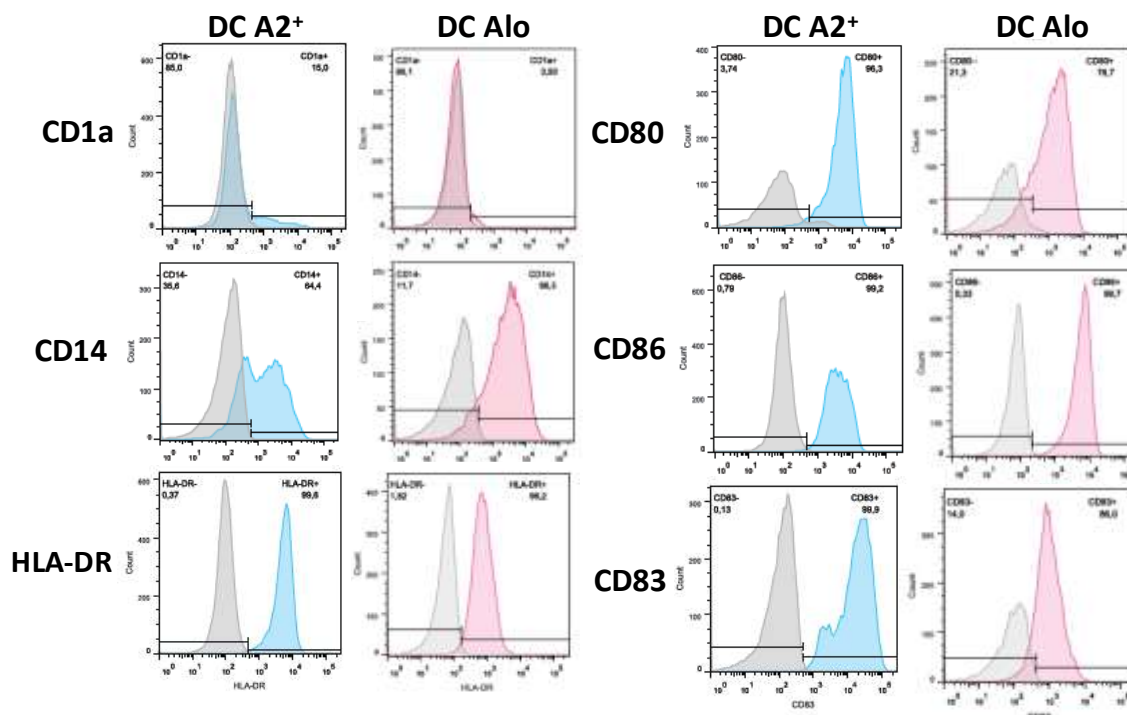


Figura 7. Comparação do fenótipo das DCs de doadores HLA-A2⁺ com as dos doadores HLA-A2⁻ tratados com Exo-A2⁺. Histogramas representativos de um experimento. Exossomos de doadores HLA-A2⁺ foram utilizados para tratamento das DCs imaturas de um doador A2⁻ juntamente com coquetel de ativação. Em cinza marcação com isotipo controle; em azul e rosa marcação específica para as moléculas identificadas à esquerda dos gráficos das DCs A2⁺ e DC Alo, respectivamente.

No total foram 7 combinações alogênicas realizadas entre DC A2⁻ (DC Alo) e exossomos alogênicos (A2⁺). Como pode ser verificado na figura 8A, tanto a frequência de DCs Alo CD1a⁺, quanto a expressão desse marcador (MFI) decaíram após tratamento com Exo-A2⁺. O tratamento também interferiu na frequência de DCs Alo CD14⁺, a qual se apresentou aumentada. Para nos certificarmos que estes resultados negativos sobre a diferenciação das DCs Alo eram decorrente dos Exo-A2⁺, decidimos realizar a comparação das DCs A2⁺ com todos os controles realizados com as DCs de doadores A2⁻, a saber: DC controle e DC tratada com a proteína PSA (Figura 8B). Como pode ser observado a menor frequência de DCs

A2⁻ CD1a⁺ e também a baixa expressão de CD1a nestas células não pareceu ser decorrentes do tratamento com Exo-A2⁺ e sim, da diferença de perfil fenotípico entre as DCs geradas de doadores HLA-A2⁺ e HLA-A2⁻.

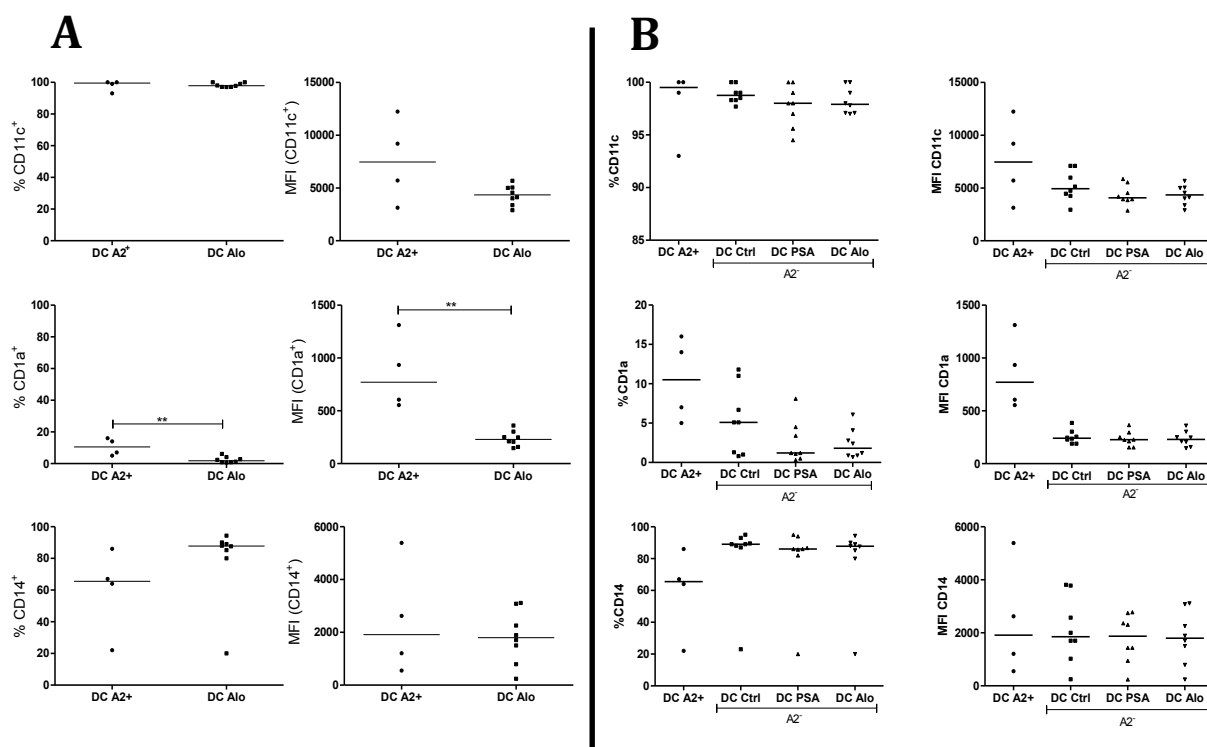


Figura 8. DCs de doadores HLA-A2⁻ apresentam fenótipo menos característico de células dendríticas do que as apresentadas por DCs de doadores HLA-A2⁺. Exossomos de doadores HLA-A2⁺ foram utilizados para tratamento das DCs doadores HLA-A2⁻. Na primeira fileira, gráficos demonstrando a frequência de células positivas e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) para o marcador CD11c, na segunda fileira para CD1a e na terceira fileira para a molécula CD14. **A.** Análise comparativa entre DCs de doadores HLA-A2⁺ e de doadores HLA-A2⁻. Teste de *Mann-Whitney*; %CD1a p=0,008; MFI CD1a p=0,004. **B.** Análise comparativa geral entre as DCs de doadores HLA-A2⁺ com todos os grupos das DCs dos doadores HLA-A2⁻. Teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. Testes realizados apenas entre as DCs dos doadores A2⁻.

Em relação aos marcadores de ativação, parece não haver diferenças quanto à frequência de DCs CD83⁺ e HLA-DR⁺ entre DC A2⁺ e DC Alo. Entretanto, foi nítida a expressão mais baixa desses marcadores nas células tratadas com exossomos (MFI CD83; p= 0,002 e MFI HLA-DR: p=0,07; marginalmente significativo). Quanto à molécula CD80 também observamos queda tanto da frequência, quanto de sua expressão nas DCs Alo. No entanto, a expressão da molécula CD86 foi nitidamente

maior nas DC Alo tratadas com Exo-A2⁺ (Figura 9A, p=0,004). Para realmente confirmar o efeito dos Exo-A2⁺ sobre as DCs dos doadores HLA-A2⁻, três grupos foram também analisados como forma de controle. O grupo denominado DC Ctrl, se refere às DCs de doadores HLA-A2⁻, somente ativadas, o grupo DC PSA, refere-se às DCs de doadores HLA-A2⁻ que foram sensibilizadas com a proteína PSA, o grupo DC Exo se refere às DCs HLA-A2⁻ que receberam Exo-A2⁺ sem a proteína PSA (este grupo foi testado duas vezes), o último grupo, DC Alo é o nosso grupo de interesse com as DCs de doadores HLA-A2⁻ sensibilizadas com a proteína PSA e tratadas com Exo-A2⁺. Como mostra figura 9B, a queda de expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD83 foi observada em todos os grupos dos doadores HLA-A2⁻, indicando com isso que a menor expressão destes marcadores não é devido ao tratamento com Exo-A2⁺. O aumento da expressão de CD86 também parece advir mais de uma diferença de haplótipos do que o tratamento com Exo-A2⁺.

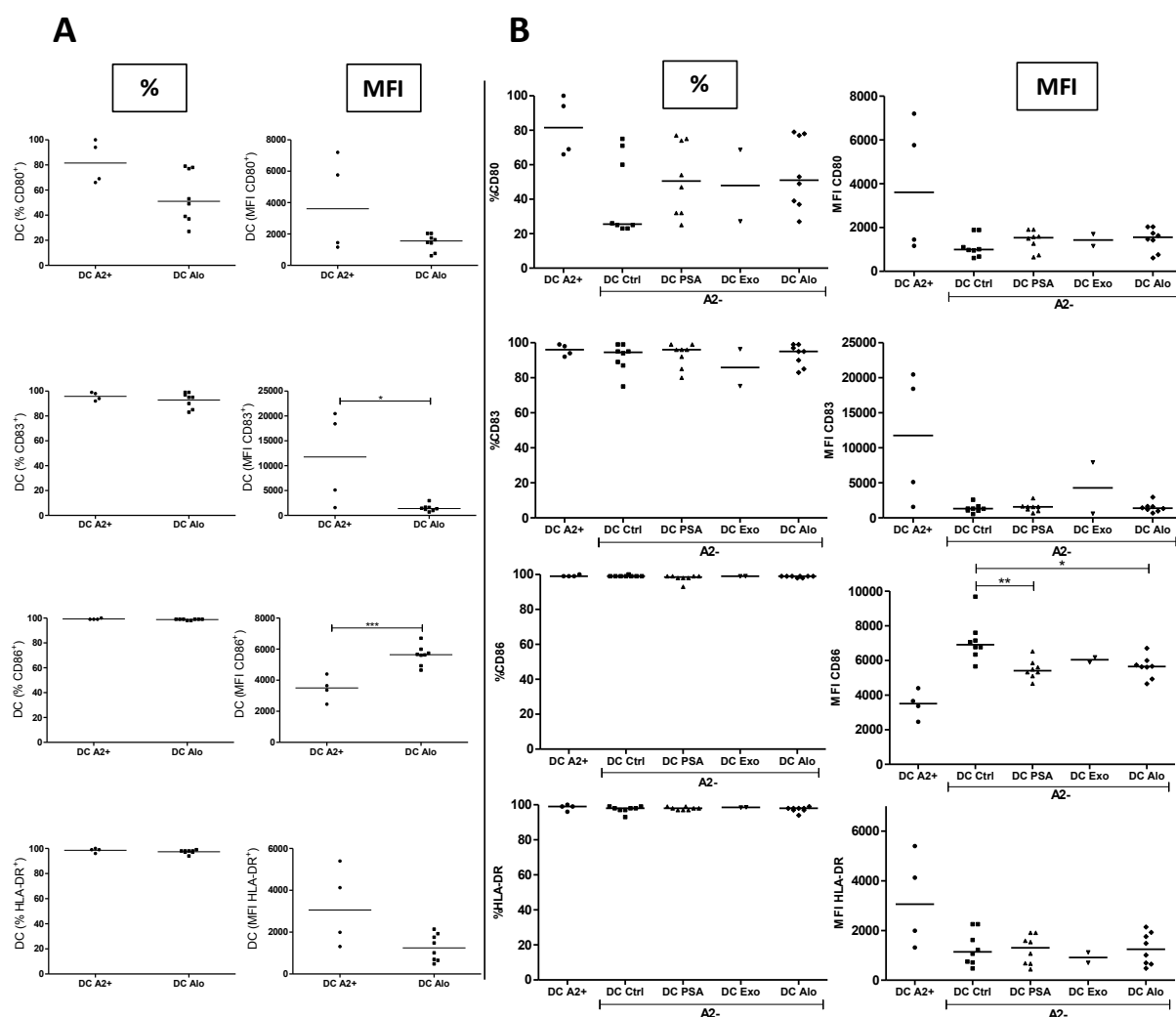


Figura 9. DCs de doadores HLA-A2⁻ apresentam fenótipo menos ativados do que as DCs de doadores HLA-A2⁺. Exossomos de doadores HLA-A2⁺ foram utilizados para tratamento das DCs doadores HLA-A2⁻. Na primeira fileira gráficos demonstrando a frequência de células positivas e intensidade mediana de fluorescência (MFI) para a molécula CD80, na segunda fileira para a molécula CD83, na terceira para CD86 e na quarta para HLA-DR. Traço horizontal refere-se à média com erro padrão. **A.** Análise comparativa entre DCs de doadores HLA-A2⁺ e de doadores HLA-A2⁻. Teste de *Mann-Whitney*; MFI CD83 p=0,002; MFI CD86 p=0,004; MFI HLA-DR p=0,07 **B.** Análise comparativa geral entre as DCs de doadores HLA-A2⁺ com todos os grupos das DCs dos doadores HLA-A2⁻. Teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. Testes realizados apenas entre as DCs dos doadores A2⁻. * p<0,05 e ** p<0,005.

4.7. Comparação de exossomos de doadores HLA-A2⁺ e doadores HLA-A2⁻.

Para verificar se os Exo liberados pelas DCs tratadas com Exo-A2⁺ apresentam aumento de expressão de moléculas características de exossomos e também envolvidas na ativação linfocitária, realizamos a fenotipagem comparativa apenas por citometria de fluxo, uma vez, que o conteúdo proteico oriundo dos Exo-

Alo não era suficiente para análise por *western blot*. A figura 10 é representativa de um experimento mostrando que os Exo-A2⁺ apresentam expressão ligeiramente maior dos marcadores característicos de exossomos, as tetraspaninas CD9, CD81 e CD63 que os Exo-Alo.

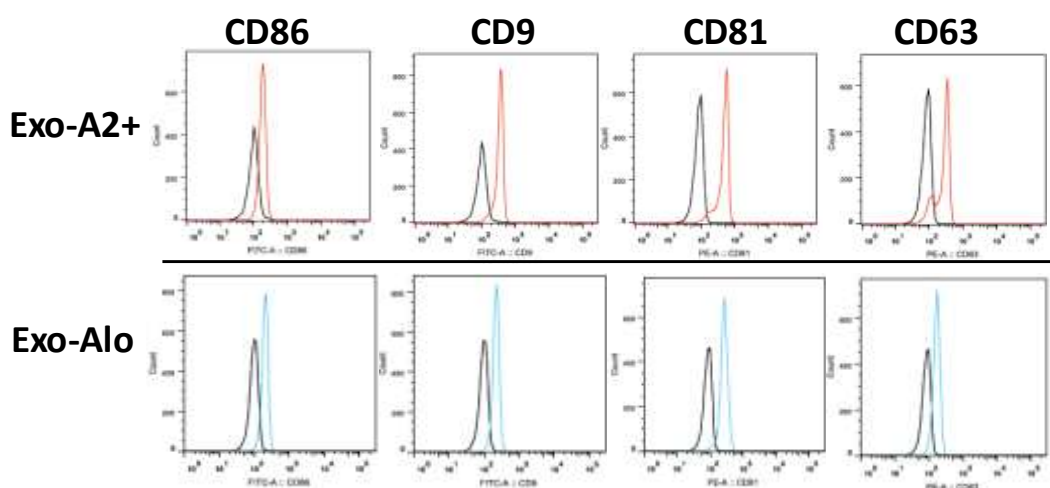


Figura 10. Comparação do fenótipo dos Exo-A2⁺ com as dos Exo-Alo de DCs dos doadores HLA-A2⁻ tratadas com Exo-A2⁺. Histogramas representativos de uma fenotipagem de Exo A2⁺ com Exo-Alo. Linha preta marcação com isotipo controle; linha vermelha e azul marcação específica para as moléculas identificadas acima dos gráficos dos Exo A2⁺ e Alo, respectivamente.

A comparação da MFI das moléculas nos Exo-A2⁺ com a dos Exo-Alo (doadores HLA-A2⁻ Figura 11A) indica níveis mais baixos de expressão das tetraspaninas CD9, CD81 e CD63. Estranhamente, a molécula CD86, que foi altamente expressa nas DCs Alo, mostra baixa expressão nos Exo-Alo delas gerados, em comparação ao Exo-A2⁺.

No delineamento deste projeto, objetivamos apenas comparar os fenótipos dos Exo de doadores A2⁺ com os Exo-Alo, no entanto, como não observamos diferenças entre os fenótipos das DCs A2⁻ dos diferentes grupos (Figura 8B e 9B), também consideramos melhor comparar os Exo-Alo com os demais exossomos obtidos das DC A2⁻ (grupos controles). **Exo-Ctrl** (obtidos de DCs A2⁻ somente ativadas); **Exo-PSA** (de DCs A2⁻ ativadas e sensibilizadas com a proteína PSA); **Exo** (obtidos de DCs A2⁻ que receberam somente Exo-A2⁺). Os exossomos obtidos

desses grupos estão em menor número que os dois conjuntos principais (Exo-A2⁺ e Exo-Alo), pois só no final do projeto decidimos fazer sua obtenção, como já justificado acima.

De modo geral, como demonstrado na figura 11B os Exo-A2⁺ apresentaram maior expressão dos marcadores analisados em comparação aos obtidos dos diferentes grupos de DC A2⁻. Entretanto, as moléculas CD63 e CD86 foram mais expressas nos Exo-Alo, que nos seus grupos controles, apresentando com isso, uma menor queda em relação ao grupo Exo-A2⁺.

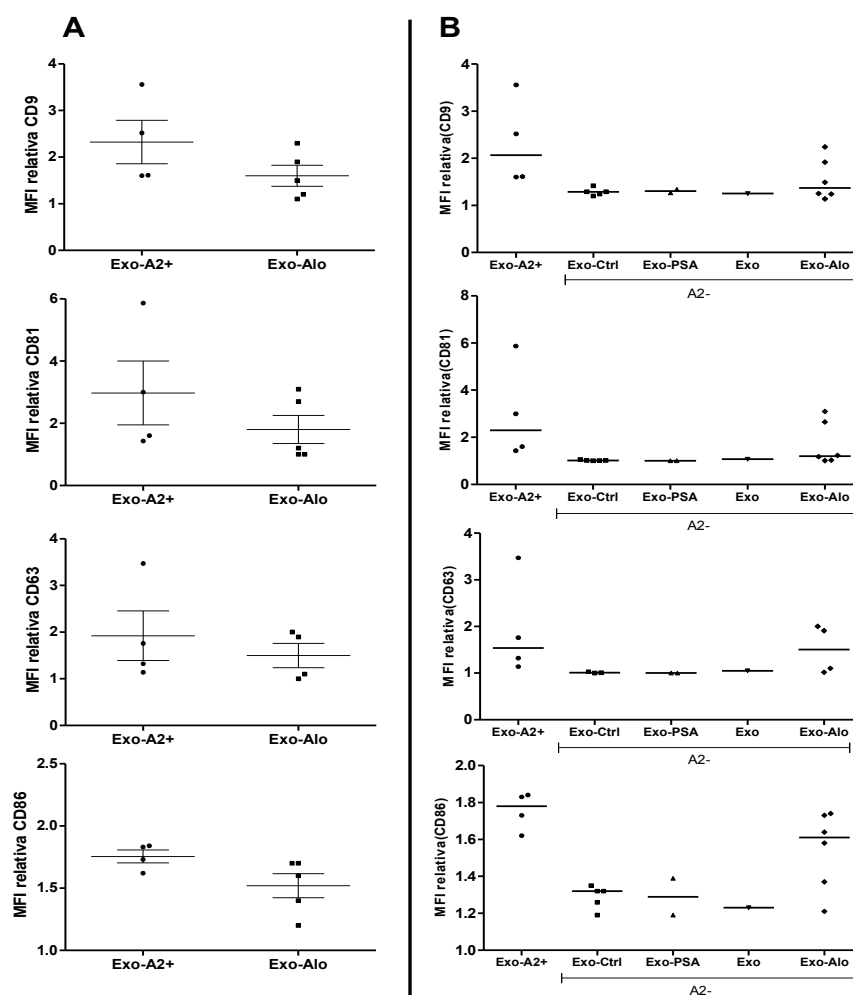


Figura 11. Análise comparativa do fenótipo dos Exo-A2⁺ de DCs de doadores HLA-A2⁺ com os Exo-Alo dos doadores HLA-A2⁻. Gráficos demonstrando a intensidade mediana de fluorescência (MFI) relativa para os marcadores CD9, CD81, CD63 e CD86. A MFI relativa é a relação entre a MFI dos marcadores específicos pela MFI do isótipo controle, dentro de cada experimento. **A.** Análise comparativa entre Exo de doadores HLA-A2⁺ e de doadores HLA-A2⁻. Teste de *Mann-Whitney*. **B.** Análise comparativa geral entre os Exo de doadores HLA-A2⁺ com todos os grupos de Exo dos doadores HLA-A2⁻. Teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. Testes realizados apenas entre as DCs dos doadores A2⁻.

5. DISCUSSÃO

Para avaliar o efeito da alogenicidade das nanovesículas sobre as DCs de doadores HLA-A2⁻ foram obtidos exossomos de doadores HLA-A2⁺. Nossos resultados demonstram que as nanovesículas obtidas por ultracentrifugação e filtração possuem fenótipo compatível ao de exossomos de DCs descritos na literatura (THÉRY et al., 2002) com expressão das tetraspaninas CD9, CD81 e CD63, além da molécula CD86. Esse fenótipo foi confirmado pela análise por *western blot*, que demonstrou a presença das moléculas HLA-DR, CD86 e HSC-70 nos Exo-A2⁺. A expressão das moléculas HLA-DR e CD86 foi, se não igual, de maior intensidade nos exossomos que nas DCs, corroborando os dados da literatura, que descrevem a alta expressão desses marcadores em exossomos de células apresentadoras de antígenos (MATSUMOTO et al., 2004).

Para enriquecimento dos exossomos obtidos, também tomamos o cuidado de trabalhar com DCs diferenciadas a partir de uma população enriquecida de células CD14⁺, na tentativa de evitar a presença de exossomos derivados de outras células mononucleares. Além disso, analisamos a viabilidade da cultura de DCs pela exclusão de morte através do marcador 7AAD. A viabilidade celular com média de 95% sustenta a obtenção de uma fração de exossomos pura, com redução da presença de corpúsculos apoptóticos.

Diante desses cuidados e resultados acreditamos que os Exo-A2⁺ utilizados para o objetivo deste trabalho são condizentes com a descrição dos exossomos encontrados na literatura.

O tratamento com Exo A2⁺ nas DCs de doadores HLA-A2⁻ (DC Alo), parece ter influenciado na diferenciação destas células, sendo observada tendência à redução na intensidade mediana de fluorescência (MFI) da molécula CD11c, nestas

células, quando comparadas com DCs A2⁺. Observamos também redução na porcentagem de DC-Alo CD1a⁺ e uma maior porcentagem de células CD14⁺ quando comparadas com DCs A2⁺. A comparação com os demais controles indica que o grupo DC Ctrl apresenta porcentagem e MFI ligeiramente maiores de CD11c que os dos outros grupos de doadores HLA-A2⁻, assim como a frequência de células CD1a⁺.

Uma possível explicação para estes resultados seria a presença de proteínas “contaminantes” junto à proteína PSA utilizada, adicionada em todos os demais grupos HLA-A2⁻, exceto no grupo DC Ctrl. De acordo com os dados do fabricante essa preparação proteica é obtida de sêmen humano e apresenta cerca de 70% de pureza. Assim é possível que nos 30% de contaminante, encontrem-se alguns dos diversos componentes com propriedades imomoduladoras produzidos nos testículos, epidídimo e glândulas acessórias (FRASER et al., 2006; OWEN; KATZ, 2005). Assim lipídios, peptídeos, diversas proteínas, além de prostaglandinas, citocinas e quimiocinas, podem interferir nas respostas imunes (PILCH; MANN, 2006; POLITCH et al., 2007; THOMPSON et al., 1992). Estudos demonstram que a diferenciação de monócitos humanos na presença de IL-4, GM-CSF e plasma seminal durante 5 dias leva à diferenciação em DCs com fenótipo semelhante ao de DCs tolerogênicas (ROSSETI et al., 2010; WÖLFLE et al., 2011), expressando altos níveis da molécula CD14 e uma significativa redução da expressão da molécula CD1a, quando comparado com o grupo controle, cultivado apenas com as citocinas de diferenciação.

Dentre as proteínas presentes no sêmen, a clusterina pode interferir na expressão de marcadores de DCs. A clusterina é um ligante de alta afinidade da molécula CD209 ou DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion*

molecule-3-Grabbing Non-integrin) (SABATTÉ et al., 2007; SABATTÉ et al., 2011), um receptor do tipo lectina C, o qual é expresso em certos tipos de DCs, incluindo DCs derivadas de monócitos (SVAJGER et al., 2011). A importância da ação da interação com DC-SIGN foi demonstrada quando iDCs foram diferenciadas na presença de ligantes de DC-SIGN (ACs H200 e 1B10), as quais passaram a apresentar significativa redução das moléculas CD1a, CD80 e CD83, quando comparadas ao grupo controle (SABATTÉ et al., 2007; SABATTÉ et al., 2011).

Em relação aos marcadores de ativação houve uma tendência a redução na MFI das moléculas CD80, CD83 e HLA-DR do grupo DC Alo, quando comparado com o grupo DC A2+. Sendo a porcentagem de células positivas para essas moléculas, similar nos dois grupos, com exceção da porcentagem de células CD80+, que aparenta uma leve redução no grupo DC Alo. O único marcador que apresentou MFI significativamente maior em DCs Alo é o CD86. Inicialmente, acreditamos que esses resultados também poderiam ser explicados devido à presença da proteína PSA no grupo DC Alo e seus possíveis contaminantes. De fato, monócitos cultivados com IL-4, GM-CSF e na presença de plasma seminal apresentaram expressão aumentada da molécula CD86 e níveis muito baixos das moléculas CD80, CD83 e CCR7 (LENICOV et al., 2012).

Contudo, quando comparamos os resultados com os grupos controles das DC A2⁺ que não receberam a proteína PSA (DC Ctrl e DC Exo), observamos que os mesmos também apresentaram uma queda na expressão das moléculas CD80, CD83 e HLA-DR e um aumento na expressão da molécula CD86, semelhante ao observado no grupo DC Alo.

Logo, esses resultados não são exclusivos da presença ou ausência da proteína PSA e uma das possíveis explicações para a diferença de resposta entre

DC A2⁺ e DC Alo seria a própria diferença de haplótipo HLA-(A, B e C) entre os doadores.

O sistema HLA é o complexo principal de histocompatibilidade humano fundamental na regulação e controle de interações entre células e a resposta imune, principalmente em interações com receptores de linfócitos T (BODMER, 1987). O *loci* HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 e codifica moléculas de superfície celular que são compostas por duas classes: Classe I (HLA-A, B e C) presente em todas as células nucleadas que se ligam e apresentam peptídeos derivados do citosol para linfócitos T CD8⁺ e moléculas Classe II (HLA-DR, DP e DQ) presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno profissionais que se ligam e apresentam peptídeos exógenos para linfócitos T CD4⁺ (BODMER, 1987).

Um grande número de doenças parece estar associada ao *loci* HLA, desde doenças infecciosas, autoimunes e alguns tipos de câncer (SINGH et al., 1997; THORSBY, 1997; HILL, 1998). O sistema HLA é altamente polimórfico, sendo que a natureza e localização desse polimorfismo permitem diferenças na ligação, estabilidade e apresentação de peptídeos, sendo esta diversidade alélica funcionalmente significativa em termos de progressão, suscetibilidade e resistência as doenças (TRACHTENBERG; ERLICH, 2001). Sendo assim, indivíduos com diferentes padrões de HLA podem apresentar respostas distintas a determinados estímulos antigênicos.

Um exemplo clássico das distinções de haplótipos HLA e progressão da doença ocorre em indivíduos portadores do HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). De fato, os alelos B35, A23, A24 e DR5 estão mais relacionados com a rápida progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), principalmente

em populações caucasianas. Por outro lado, alelos A25, A26, A68, A23, A32 parecem estar associados a uma lenta progressão de indivíduos HIV positivos a desenvolver AIDS. Esses alelos parecem estar envolvidos com genes do complexo TAP, que estão envolvidos no transporte e processamento de antígenos, levando peptídeos antigênicos ao retículo endoplasmático, onde se ligam às moléculas HLA classe I, podendo assim, serem apresentados aos linfócitos T CD8+ (TRACHTENBERG; ERLICH, 2001). O alelo B27 também parece ter um papel protetor em indivíduos com o vírus HIV. Acredita-se que indivíduos HLA-B27 conseguem controlar melhor a doença devido a capacidade de seus linfócitos T citotóxicos reconhecerem o epítipo Gag p24, uma proteína conservada no vírus HIV. Foi observado que mutações neste epítipo levam a uma alteração na conformação levando a perda de função do peptídeo e quase sempre à formação de um vírus não viável. E mesmo quando o vírus sobrevive à mutação, foi demonstrado que os linfócitos T citotóxicos dos indivíduos HLA-B27 ainda conseguem reconhecer o epítipo Gag p24 mutado (TRACHTENBERG; ERLICH, 2001; UYL, D., et al., 2004).

Diversas outras doenças também apresentam fortes associações com o sistema HLA, como por exemplo, a espondilite anquilosante e o alelo B27; diabetes mellitus tipo I e os alelos DR3 ou DR4 e a narcolepsia e o alelo DR2 (BODMER, 1987).

Outro estudo realizado com indivíduos HLA-A2+ demonstrou que células mononucleares tratadas com citrato férrico na concentração de 1.0mM obtiveram uma porcentagem de resposta significativamente maior na reação leucocitária mista, quando comparados com indivíduos HLA-A2-. Esse perfil de resposta diferenciado entre doadores HLA-A2+ e HLA-A2- também foi observado em estudos realizados

em pacientes com leucemia linfóide aguda, sugerindo que a presença do alelo HLA-A2+ confere uma maior proteção contra a doença (BRYAN et al., 1981). Fato também observado em pacientes com leucemia mielóide aguda. (VON FLIEDNER et al., 1980).

Sendo assim o simples fato dos indivíduos possuírem fenotipagem HLA-A diferente (e provavelmente de outros haplótipos não identificados) pode ter contribuído nas diferenças fenotípicas observadas, como maior expressão das moléculas CD11c, CD1a, CD80, CD83 e HLA-DR em doadores HLA-A2⁺. Além disso, a especificidade do peptídeo PSA-1 utilizado para a molécula HLA-A2⁺, pode conferir maior estabilidade de ligação, o que, pode exercer influência na resposta funcional em detrimento do perfil fenotípico observado.

Esta especificidade ao peptídeo PSA parece ter influenciado também o fenótipo dos exossomos liberados pelas DC A2⁺, uma vez que carregaram mais CD9, CD81, CD63 e CD86, que os Exo-Alo, originados das DCs A2⁻.

Isto pode ser explicado pelo fato de exossomos serem uma espécie de mini reflexo da célula de origem, carregando diversas proteínas, lipídios e inclusive material genético desta célula consigo. Contudo o processo de biogênese dos Exo ainda não é bem conhecido. Sabe-se que há um conjunto de proteínas intracelulares que parece estar diretamente relacionado com a inclusão de moléculas para dentro dos corpos multivesiculares (MVBs), dos quais se formam os exossomos. (BUSCHOW et al., 2005; VAN NIEL et al., 2006; LAKKARAJU et al., 2008; WOLLERT et al., 2010). Algumas dessas proteínas formam um complexo denominado ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*), que reconhecem proteínas monoubiquitinadas e a sequestram para os MVBs (WOLLERT et al., 2010). Sendo assim, é possível que o direcionamento de algumas

moléculas seja preterido em relação a outras devido à sua ubiquitinação. Entretanto, a constituição dos MVBs pode ocorrer na ausência de subunidades do complexo ESCRT, fato que indica a existência de mecanismos alternativos na biogênese dos exossomos (STUFFERS et al., 2009)

Apesar de se assemelharem muito à sua célula de origem, os Exo podem também expressar proteínas exclusivas. De fato, existem microRNAs (miRNAs) e mRNAs que são detectados ou nas células ou nos Exo delas liberados, o que sugere uma seleção preferencial de certas sequências de RNA nos exossomos as quais codificam diferentes moléculas (VALADI et al., 2007; MITTELBRUNN et al., 2011)

Levando tudo isso em consideração percebe-se que no processo de biogênese dos exossomos há uma seleção de mRNA, lipídios e proteínas específicas para a formação destas nanovesículas, sendo que nem sempre o que é expresso na célula de origem será expresso também nos exossomos por ela gerados. Isto pode explicar o fato dos Exo-Alo apresentarem uma menor expressão da molécula CD86, quando comparado com suas células de origem (DC-Alo). Também observamos que apesar da expressão das moléculas CD63 e CD86 ter sido menor nos Exo-Alo em relação aos Exo-A2⁺, há uma expressão mais elevada destas moléculas nos Exo-Alo, quando comparado aos seus controles (Exo-Ctrl, Exo-PSA, Exo).

Quando interagem com algumas células, os exossomos podem também interferir no funcionamento de seus mRNAs, os quais codificam, por exemplo, moléculas estimuladoras (PEGTEL et al., 2010). Talvez a sensibilização das DCs HLA-A2⁻ com Exo-A2⁺ e proteína PSA tenha favorecido maior expressão das moléculas CD63 e CD86 nos exossomos por elas gerados, que em seus controles.

Sendo assim, dependendo do estímulo recebido, diferentes fenótipos podem ser produzidos nos exossomos.

Sabe-se que a linhagem ou estágio de ativação das células de origem acabam interferindo na presença ou não de algumas moléculas nos exossomos como moléculas de adesão e integrinas. Por exemplo, exossomos originados de DCs imaturas têm expressão mais baixa de ICAM-1, CD86 e MHC-II, quando comparados com aqueles gerados de DCs maduras (MONTECALVO et al., 2008; QAZI et al., 2009; SEGURA et al., 2005; UTSUGI-KOBUKAI et al., 2003). Como as células dos doadores HLA-A2⁻, apresentaram um fenótipo mais imaturo que as células dos doadores HLA-A2⁺, isto é, com menor expressão de HLA-DR, CD80 e CD83, isso pode ter interferido na expressão das moléculas presentes nos Exo-Alo, visto que todas as moléculas aqui analisadas estavam em menor quantidade que as observadas nos Exo-A2⁺.

De modo geral, nossos resultados indicam que o tratamento com exossomos alogênicos conferiu aumento da expressão da molécula CD86 nas DCs A2⁻. No entanto, este tratamento não foi suficiente para conferir o aumento das demais moléculas envolvidas na ativação linfocitária, a saber, HLA-DR, CD80 e CD83. Além disso, a diferença de haplótipos (HLA-A2⁺ X HLA-A2⁻) parece sobrepor qualquer efeito oriundo da alogenicidade ou mesmo do tratamento com a proteína PSA. Essa diferença observada também foi presente nos exossomos gerados dos doadores A2⁻, que de modo geral, apresentaram marcação inferior das moléculas analisadas: CD86, CD9, CD81 e CD63.

Assim, **concluimos que embora o tratamento com Exo alogênico não tenha conferido imunogenicidade completa às DCs e nem aos exossomos**

delas liberados, outros fatores, como a diferença de haplótipos entre os grupos parece ter influência diretamente nos resultados observados.

6. Referências Bibliográficas

ARINA, A., et al., Clinical implications of antigen transfer mechanisms from malignant to dendritic cells. exploiting cross-priming. **Exp Hematol.** v. 30, n. 12, p. 1355-64. 2002.

BANCHEREAU, J. and A.K. PALUCKA, Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nat Rev Immunol.** v. 5, n. 4, p. 296-306. 2005.

BANCHEREAU, J. and R.M. STEINMAN, Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.** v. 392, n. 6673, p. 245-52. 1998.

BANCHEREAU, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol.** v. 18, p. 767-811. 2000.

BODMER W.F., The HLA system: structure and function. **J Clin Pathol.** v. 40, n. 9, p. 948-58. 1987.

BRETZ, N.P., RIDINGER, J., and RUPP, A.K, Body fluid exosomes promote secretion of inflammatory cytokines in monocytic cells via Toll-like receptor signaling. **J Biol Chem.** v. 288, n. 51, p. 36691-702. 2013.

BRYAN C.F. et al., Differential inhibition of the MLR by iron: association with HLA phenotype. **Immunogenetics.** v.12, n. 1; n. 2, p, 129-40. 1981.

BUSCHOW S.I. et al., Exosomes contain ubiquitinated proteins. **Blood Cells Mol Dis.** v. 35, n. 3, p. 398-403. 2005.

CAUX, C., et al., Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. **J Exp Med.** v. 180, n. 4, p. 1263-72. 1994.

CHAPUT, N. and C. THÉRY, Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. **Semin Immunopathol.** v. 33, n. 5, p. 419-40. 2011.

CHAPUT, N., et al., Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. **J Immunol.** v. 172, n. 4, p. 2137-46. 2004.

CHAPUT, N., et al., The potential of exosomes in immunotherapy of cancer. **Blood Cells Mol Dis.** v. 35, n. 2, p. 111-5. 2005.

FRASER L.R., et al., Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. **Biosci.** v. 1, n. 11, p. 1636-45. 2006.

FREEDLAND, S.J., et al., The prostatic specific antigen era is alive and well: prostatic specific antigen and biochemical progression following radical prostatectomy. **J Urol.** v. 174, n. 4 Pt 1, p. 1276-81; discussion 1281;author reply

1281. 2005.

GONG, J., et al., Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. **J Immunol.** v. 165, n. 3, p. 1705-11. 2000.

GUERMONPREZ, P., et al., Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p. 621-67. 2002.

HAO, S., et al., Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8⁺ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes. **Cell Mol Immunol.** v. 3, n. 3, p. 205-11. 2006.

HARDING, C., J. HEUSER, and P. STAHL, Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **J Cell Biol.** v. 97, n. 2, p. 329-39. 1983.

HIGANO, C.S., et al., Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. **Cancer.** v. 115, n. 16, p. 3670-9. 2009.

INCA. Estimativas 2012. Incidências de Câncer no Brasil. 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em 10 nov 2014.

KANTOFF, P.W., et al., Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **N Engl J Med.** v. 363, n. 5, p. 411-22. 2010.

LAKKARAJU A., E. RODRIGUEZ-BOULAN, Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. **Trends Cell Biol.** v. 18, n. 5, p. 199-209. 2008.

LÄSSER, C., M. ELDH, and J. LÖTVÄL, Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **J Vis Exp.**(59):e3037. 2012.

LÄSSER, C., V. S. ALIKHANJ, and K. EKSTRÖM, Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages, **J Transl Med.** v. 9, n. 9, p. 1-8. 2011.

LENICOV, F.R. et al., Semen Promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. **J Immunol.** v. 189, n. 10, p. 4777-86. 2012.

LUDWIG, A.K. and B. GIEBEL, Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 44, n. 1, p. 11-5. 2012.

MATHIVANAN, S. and R.J. SIMPSON, ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. **Proteomics.** v. 9, n. 21, p. 4997-5000. 2009.

MATSUMOTO, K., T. MORISAKI, and H. KUROKI, Exosomes secreted from monocyte-derived dendritic cells support in vitro naïve CD4⁺ T cell survival through NF-(kappa)B activation. **Cell Immunol.** v. 231, n. 1; n. 2, p. 20-9. 2004 .

MITTELBRUNN, M. et al., Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigenpresenting cells. **Nature Commun.** v. 2, p. 282. 2011.

MIYANISHI, M., et al., Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. **Nature.** v. 450, n. 7168, p. 435-9. 2007.

MONTECALVO, A. et al., Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. **J. Immunol.** v. 180, p. 3081–3090. 2008.

NOLTE-'T HOEN, E.N., et al., Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. **Blood.** v. 113, n. 9, p. 1977-81. 2009.

OWEN D.H, and D.F. KATZ, A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. **J Androl** v. 26, n 4, p. 459-69. 2005.

PALUCKA, K. and J. BANCHEREAU, Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat Rev Cancer.** 12(4): p. 265-77. 2012.

PAN, B.T., et al., Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **J Cell Biol,** v. 101, n. 3, p. 942-8. 1985.

PEGTEL,D. M. et al., Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **Proc. Natl Acad.** v. 107, p. 6328–6333. 2010.

PILCH, B., and M. MANN, Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. **Genome Biol.** v. 7, n. 5, p. R40. 2006.

POLITCH, J. A. et al. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. **Hum. Reprod.** v. 22, p. 2928-2935. 2007.

QAZI, K. R. et al., Antigen-loaded exosomes alone induce TH1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. **Blood.** v. 113, p. 2673–2683. 2009.

RAMOS, R.N., et al., Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **J Leukoc Biol.** v. 92, n. 3, p. 673-82. 2012.

RAPOSO, G., et al., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med.** v. 183, n. 3, p. 1161-72. 1996.

ROEHL, K.A., et al., Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. **J Urol.** v. **172**, n. 3, p. 910-4. 2004.

ROMAGNOLI, G.G., **Exossomos Derivados de Células Dendríticas Como Adjuvantes Naturais Na Resposta Antitumoral.** 2012. p. 142. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ROMAGNOLI, G.G., Tumor cells incorporate exosomes derived from dendritic cells through a mechanism involving the tetraspanin CD9. **Exosomes and Microvesicles.** v. 1, p. 21-32. 2013.

ROSSETTI, M. et al., Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naïve T cells. **Eur. J. Immunol.** v. 40, p. 3097-3106. 2010.

SABATTÉ, J. et al., Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. **J. Virol.** v. 81, p. 13723-13734. 2007.

SABATTÉ, J. et al., The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. **Microbes Infect.** v. 13, p. 977-982. 2011.

SALLUSTO, F. and A. LANZAVECCHIA, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med.** v. 179, n. 4, p. 1109-18. 1994.

SEGURA, E. et al., ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. **Blood.** v. 106, p. 216–223. 2005.

SHURIN, M.R. and R.D. SALTER, Dendritic Cells in Cancer. 1st ed: **Springer.** 396. 2009.

SIMPSON, R.J., S.S. JENSEN, and J.W. LIM, Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics.** v. 8, n. 19, p. 4083-99. 2008.

SINGH S.P.N, N. K. MEHRA, and H.B. DINGLEY, Infectious diseases and immunity : special reference to Major Histocompatibility Complex. **Emerging Infectious Diseases** v. 3, p. 41-49. 1997.

SKOKOS, D., et al., Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. **J Immunol.** v. 166, n. 2, p. 868-76. 2001.

SOBO-VUJANOVIC A., MUNICH S, and VUJANOVIC N.L., Dendritic-cell exosomes cross-present Toll-like receptor-ligands. **Cellular Immunology** ; V. 289, n. 1; n. 2, p. 119-127. 2014.

STEINMAN, R.M. and J. BANCHEREAU, Taking dendritic cells into medicine. **Nature**. v. 449, n. 7161, p. 419-26. 2007.

STEINMAN, R.M. and Z.A. COHN, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**. v. 137, n. 5, p. 1142-62. 1973.

STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**. v. 9, p. 271-96. 1991.

STUFFERS, S. et al., Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic**. v. 10, p. 925–937. 2009.

SVAJGER, U. et al., DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. **J. Leukoc. Biol**. v. 89, p. 893-905. 2011.

THÉRY, C., L. ZITVOGEL, and S. AMIGORENA, Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**. v. 2, n. 8, p. 569-79. 2002.

THÉRY, C., M. OSTROWSKI, and E. SEGURA, Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**. v. 9, n. 8, p. 581-93. 2009.

THOMPSON, L. A. et al., The leukocytic reaction of the human uterine cervix. **Am. J. Reprod. Immunol**. v. 28, p. 85-89. 1992.

THORSBY E., HLA Associated Diseases. **Human Immunology**. v. 53, p. 1-11. 1997.

TRACHTENBERG, E. and H. A. ERLICH, A Review of the Role of the Human Leukocyte Antigen (HLA) System as a Host Immunogenetic Factor Influencing HIV Transmission and Progression to AIDS. 1-43-60. Disponível em: <www.hiv.lanl.gov/content/.../1/4-trachtenburg.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2014.

UTSUGI-KOBUKAI, S. et al., MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. **Immunol**. v. 89, p. 125–131. 2003.

UYL D. et al., Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27?. **AIDS Rev**. v. 6, n. 2, p. 89-96. 2004.

VALADI, H. et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biol**. v. 9, p. 654–659. 2007.

VAN NIEL G. et al., Exosomes: a common pathway for a specialized function. **J Biochem**. v. 140, n. 1, p. 13-21. 2006.

VIAUD, S., et al., Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? **Cancer Res.** v. 70, n. 4, p. 1281-5. 2010.

VON FLIEDNER V.E., Z. SULTAN-KHAN, and M. JEANNET, HLA-DRw antigens associated with acute leukemia. **Tissue Antigens.** v.16, n. 5, p. 399-404. 1980.

WOLFERS, J., et al., Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nat Med.** v. 7, n. 3, p. 297-303. 2001.

WÖLFLE, S. J. et al., PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. **Eur. J. Immunol.** v. 41, p. 413-424. 2011.

WOLLERT T., and J. H. HURLEY, Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. **Nature.** v. 464, n. 7290, p. 864-9. 2010.

YANAGIHARA, S., et al., EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. **J Immunol.** v. 161, n. 6, p. 3096-102. 1998.

ZAKHAROVA, L., M. SVETLOVA, and A.F. FOMINA, T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. **J Cell Physiol.** v. 212, n. 1, p. 174-81. 2007.

ZITVOGEL, L. et al., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nat Med.** v. 4, n. 5, p. 594-600. 1998.