

MARIANA SOUSA VIEIRA SALDANHA

*Vesículas extracelulares circulantes de pacientes
com câncer de mama induzem células dendríticas
tolerogênicas modulando GSK3*

Belo Horizonte
Minas Gerais Brasil
Setembro – 2020

MARIANA SOUSA VIEIRA SALDANHA

*Vesículas extracelulares circulantes de pacientes
com câncer de mama induzem células dendríticas
tolerogênicas modulando GSK3*

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago

Dr. Rodrigo Ribeiro Resende

Co-Orientador: Dr. Adriano de Paula Sabino

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Setembro -2020

043

Saldanha, Mariana Sousa Vieira.

Vesículas extracelulares circulantes de pacientes com câncer de mama induzem células dendríticas tolerogênicas modulando GSK3 via miRNA [manuscrito] / Mariana Sousa Vieira Saldanha. - 2020.

151 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadores: Prof. Dr. Helton da Costa Santiago e Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende. Coorientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Células Dendríticas. 2. Vesículas Extracelulares. 3. Neoplasias da Mama. 4. MicroRNAs. 5. Glicogênio Sintase Quinase 3 beta. I. Santiago, Helton da Costa. II. Resende, Rodrigo Ribeiro. III. Sabino, Adriano de Paula. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA SOUSA VIEIRA. Aos três dias do mês de setembro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Vesículas extracelulares circulantes de pacientes com câncer de mama induzem células dendríticas tolerogênicas modulando GSK3 via miRNA", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Marina Diniz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. João Trindade Marques (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (CPqRR/Fiocruz/MG), aprovada; Dra. Cristina Bonorino (UFCSPA), aprovada; Dr. Rodrigo Ribeiro Resende - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Adriano de Paula Sabino - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 03 de setembro de 2020.

Dra. Marina Diniz (UFMG) 

Dr. João Trindade Marques (UFMG) 

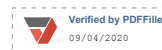
Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (CPqRR/Fiocruz/MG) 

Dra. Cristina Bonorino (UFCSPA) 

Dr. Adriano de Paula Sabino - Coorientador (UFMG) 

Dr. Rodrigo Ribeiro Resende - Orientador (UFMG) 

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG) 



AGRADECIMENTOS

A Deus

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Muitos foram os momentos de alegria, porém a angústia, medo e desespero também esteve presente em meu dia a dia e Ele nunca me deixou sentir sem esperança. A Ele, toda a honra e toda a graça.

À minha família

Gostaria de agradecer especialmente à minha família. Meus pais, José Maria e Neide, que trabalharam muito em suas vidas para que pudesse ter oportunidade de estudo público de qualidade. Me mostraram que é possível visualizar grandes conquistas com perseverança, força, fé e com o melhor de si. Minha irmã, Alana, que sua luta, trabalho e amor sempre foram intensamente presentes em minha vida. Meu irmão, Eduardo, que sempre me apoia, respeita e, inclusive, me inspira cientificamente. Vocês são luz na minha vida. Meu marido, Thiago Saldanha, que não tenho nem palavras de agradecimento pelo apoio intenso e sempre presente em todos os aspectos de minha vida. Seu incentivo, amor, atenção e companheirismo me permite ser sempre uma pessoa melhor. Obrigada por tudo, por você estar e ser presente em minha vida. Ah, obrigada por todas as correções também, afinal, marido também é para isso (kkk). Agradeço também à minha avó, Maria Jovita, que seu amor e carinho, até em forma de comidas, me fortaleceu em dias incertos. Foi pesado. Mas com vocês e por vocês, consegui vencer mais um ciclo de minha vida.

Aos amigos de profissão

Eram muitas as diferenças, mas o sonho é único. Durante toda a minha formação, tive a oportunidade de conhecer, interagir e fazer muitas amizades. Amizades sim, é possível. Quando cheguei em Belo Horizonte, meu primeiro contato foi no laboratório de Sinalização Celular e Nanotecnologia, na época, possuíam 5 pessoas, incluindo um anjo, também com atribuição de técnico de laboratório, chamado Jamil. Irei começar por ele. Jamil me ajudou em tudo, me ajudou a entender como era o sistema do laboratório, me ouviu, conversou e ajudou em vários procedimentos, inclusive as mil etapas de ultracentrifugações em horários atípicos. Anderson, rosto amigável da UFSJ, foi maravilhoso ter você no laboratório em que estava me

inserindo. Você é um poço de conhecimento e sabedoria. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio. Rebecca, inclusive parceira de apartamento, você me ensinou muito! Foi e sempre será uma cientista que admiro muito! Muito sábia, honesta e exigente rs.

Após 8 meses de doutorada, fui adotada pelo laboratório IMPAR, para que pudesse ter uma orientação mais próxima do Prof. Helton. Lá pude realmente ser inserida em uma família. O espírito de coletividade, amizade e companheirismo são as marcas do laboratório IMPAR. Em especial, gostaria de agradecer à Michele, uma companheira e irmã que encontrei lá. Você é maravilhosa, te admiro demais! Ao Tertuliano, no seu jeito calado, mas certo. À Gabriela, minha eterna melhor IC do mundo! Você é maravilhosa. À Camila, uma irmã de alma que encontrei. Seu apoio, amor, carinho e presença, mesmo dos EUA, foram cruciais para mim. Obrigada, MESMO! Agradeço também à Stephanie, Rafa, Javier, Marcela, Gregório, Laila, Iracema e Sara.

Ao final do doutorado, em meio a tantas mudanças pessoais e no cenário científico, veio também a mudança física do laboratório do Prof. Rodrigo. Com ela, tive a oportunidade de conhecer outros profissionais excepcionais que me ajudaram (muito) principalmente nos testes *in vivo*. Obrigada Walisson, você é um gigante (um mestrando, nível pós-doc admirável), obrigada Carol Leonel, por toda força, incentivo e carinho. Seu apoio foi essencial. Obrigada Pedro Dias, você é maravilhoso, excelente pesquisador. Seu futuro é brilhante. Obrigada a todos por acreditarem no meu potencial.

Aos mestres

O trabalho com vesículas extracelulares foi desafiador. Este ainda é um tema relativamente recente na literatura e falta consenso, inclusive, na definição e métodos de isolamento confiáveis.

Gostaria de agradecer ao Prof. Rodrigo Resende, por aceitar me orientar em um projeto totalmente novo, de meu interesse. Obrigada por acreditar em mim, em meu potencial e me permitir desenvolvê-lo. Obrigada sempre pelos conselhos mais prudentemente loucos e certos na pesquisa. Você é foda.

Gostaria de agradecer ao Prof. Helton. Não foi uma situação fácil, eu sei. Orientar uma pessoa, quem mal conhece, desenvolvendo uma pesquisa diferente é desafiador e imagino, até amedrontador. Mas acima de tudo, você me aceitou e se tornou um modelo de orientador referência para mim. Você discutiu meu projeto, vivenciou ele comigo muito mais que qualquer outra pessoa. Você me incentivou a pensar, pesquisar e me preparar para qualquer

questionamento seu. Meu respeito, admiração e agradecimento por você é imensurável. Obrigada por acreditar em mim. Obrigada por me aceitar fazer parte do “Team Mara”.

Agradeço ao prof. Adriano Sabino por aceitar me co-orientar de prontidão, por sempre acompanhar o andamento de meu projeto e realizar várias sugestões pertinentes. Muito obrigada pela confiança, apoio e incentivo.

Agradeço aos meus primeiros orientadores, Prof. Daniel Bonoto e Prof. Alexsandro Galdino, por todos os ensinamentos e iniciação no cenário científico e a Prof. Nayara que sempre me incentivou e se tornou presente como orientadora do mestrado e me trouxe à área de imunologia tumoral. Agradeço pela oportunidade, ensinamentos e incentivo pessoal, científico e espiritual. Agradeço a todos os mestres, professores e amigos que contribuíram de forma singular de minha formação, aprendizagem, delineamento experimental e em diferentes outros aspectos do meio acadêmico para que pudesse me tornar cada vez melhor. Meus sinceros agradecimentos.

Às agências de fomento

Gostaria de agradecer todas as instituições que tornaram essa tese possível. À Universidade Federal de Minas Gerais, Campus CCO e Hospital do Câncer de Divinópolis, pelo delineamento, parcerias e coleta das amostras, visto que o projeto se iniciou durante meu mestrado na UFSJ. Gostaria de agradecer ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais por toda infraestrutura para realização deste trabalho e formação no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia. Agradeço ao Instituto René-Rachou, pelo uso da plataforma de citometria que possibilitou a realização dos experimentos. Agradeço à plataforma de multiusuários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/Faculdade de Farmácia UFMG, pelo uso do citometro LSRTFortessa.

Por fim, deixo minhas sinceras boas energias à atual situação da pesquisa brasileira. Vivenciamos época de mudanças, restrições, cortes e falta de incentivo. Tempos que muitas pessoas se encontram desmotivadas e sem oportunidades. Sinceramente, desejo que tempos melhores se iniciem e se instaurem, de forma definitiva e progressiva.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.

(Augusto Branco)

RESUMO

Introdução: A comunicação celular através de vesículas extracelulares (EVs) emergiu recentemente como importante modulador do desenvolvimento da resposta imune e do estabelecimento tumoral. Este estudo avaliou a capacidade das EVs de pacientes com câncer de mama ductal invasivo para induzir alterações fenotípicas e funcionais na diferenciação *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DC) e na consequente alterações na ativação de células T. Os possíveis mecanismos envolvidos também foram investigados.

Metodologia: EVs foram isoladas por ultracentrifugação do plasma de doadores saudáveis (HD) e pacientes com câncer de mama (BC). A diferenciação *in vitro* de Mo-DCs foi realizada com monócitos obtidos de doadores saudáveis na presença de HD ou BC EVs (30 µg / mL), no dia zero. Mo-DCs foram ativados com LPS (50 ng/mL) após cinco dias de cultura para induzir maturação. Após 48 horas de maturação, as Mo-DCs foram analisadas fenotipicamente por citometria de fluxo. A avaliação funcional das Mo-DCs geradas e o perfil de resposta imune adaptativa induzida pela Mo-DCs derivadas na presença de EVs foram realizados por ensaio alogênico de proliferação de linfócitos T (MLR). As vias de sinalização intracelular foram avaliadas em Mo-DCs ativadas por LPS após 5 e 30 minutos. Para investigar mecanismos possíveis pelas quais as BC EVs estavam modulando as Mo-DCs, realizamos a análise de possíveis miRNAs enriquecidos em EVs de pacientes com câncer de mama. Além disso, foram realizados testes *in vivo* para verificar a modulação sistêmica de EVs diante de uma resposta infecciosa e associada ao tumor. A linhagem 4T1 foi usada para induzir o tumor. Como esta linhagem é estabelecida para BALB/c e animais imunossuprimidos, o modelo de infecção foi escolhido com base em um modelo bem caracterizado para essa linhagem animal: a infecção principal por *Leishmania major*. **Resultados:** As Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer apresentaram fenótipo com expressão diminuída de HLA-DR (p <0,001), CD80 (p <0,01), CD86 (p <0,001) e CD11c (p <0,001) quando comparadas a Mo-DCs diferenciados com EVs HD. Além disso, observamos que as DCs diferenciadas com os EVs de pacientes com câncer apresentaram capacidade diminuída de induzir a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (p <0,05), aumento da expressão de receptores inibitórios e diminuição dos níveis de IL-12, IL-6, IL-4, IL-2 e IFN-gama no sobrenadante da MLR. Por outro lado, foram observados níveis aumentados de linfócitos T reguladores (p <0,001) e produção de IL-10 (p <0,05). Mo-DCs diferenciadas na presença de BC EVs apresentaram menor ativação da via mTOR, mesmo após estimulação induzida, não foi observada a inativação de GSK-3β, sendo que este é um processo importante para maturação de Mo-DCs com perfil inflamatório. Foi identificada a presença de miR-181b-5p, apenas em EVs de pacientes com câncer de mama, que regula a proteína de interação a GSK-3β (GSKIP), que possui como função a inativação de GSK-3β. Em animais com indução tumoral e tratados com EVs foi possível identificar a modulação da resposta imune à infecção, observando um menor infiltrado inflamatório de células responsáveis por mediar uma resposta imune local contra o parasita, além de uma forte resposta Th2, maior lesão, combinada com maior crescimento tumoral, quando comparado ao grupo controle de infecção por *L. major* e tumor induzido. **Conclusão:** EVs específicos de pacientes com câncer de mama modulam, através do miR-181b, a inativação de GSK-3β em DCs. Esta modulação promove alterações fenotípicas e funcionais nas Mo-DCs induzindo um estado supressor da resposta imune adaptativa.

Palavras-chave: célula dendrítica, vesículas extracelulares, câncer de mama, miR-181b-5p, GSK-3β.

ABSTRACT

Introduction: Cellular communication through extracellular vesicles (EVs) emerged recently as important modulators of the immune response development and establishment of cancer. This study evaluated the ability of EVs from patients with invasive ductal breast cancer to induce phenotypical and functional changes in *in vitro* differentiation of monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) and T cells activation. The possible mechanisms involved in these changes were also investigated. **Methodology:** For this, the EVs were isolated, by ultracentrifugation, from plasma of healthy donors (HD) and patients with breast cancer (BC). *In vitro* differentiation of Mo-DCs was performed with monocytes obtained from healthy donors in the presence of HD or BC EVs (30 µg/mL), at day 0. Mo-DCs were activated with LPS (50 ng / mL) after five days of culture to induce maturation. After 48 hours of maturation, the Mo-DCs were analyzed phenotypically by flow cytometry. The functional evaluation of generated Mo-DCs and the adaptive immune response profile were performed by allogeneic T lymphocyte proliferation assay (MLR). The intracellular signaling pathways were evaluated after 5 and 30 minutes of LPS-activation that Mo-DCs. To investigate possible mechanisms by which BC EVs were modulating Mo-DCs, we performed the analysis of possible enriched miRNAs in this EVs. In addition, *in vivo* tests were performed to check the systemic modulation of EVs in the face of an infectious and tumor-associated response. The 4T1 cells were used to induce the tumor in BALB/c mice, since this cancer cell strain can establish in BALB/c and immunosuppressed animals. The infection model was chosen based on a well-characterized *Leishmania major* infection. **Results:** DCs differentiated in the presence of EVs from cancer patients showed altered phenotype with decreased expression of HLA-DR (p <0.001), CD80 (p<0,01), CD86 (p <0.001) and CD11c (p <0.001) when compared to DCs differentiated with HD EVs. In addition, we observed that DCs differentiated with EV from cancer patients displayed impaired ability to induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation (p<0,05), increased expression of inhibitory receptors and decreased levels of IL-12, IL-6, IL-4, IL-2 and IFN-gama in the supernatant of the MLR. On the other hand, increased levels of regulatory T lymphocytes (p<0,001) and IL-10 production (p<0,05) were observed. Differentiated Mo-DCs in the presence of BC EVs showed less activation of the mTOR pathway, even after induced stimulation. Besides that, GSK-3β inactivation was not observed, an important pathway for the generation of Mo-DCs with an inflammatory profile. The presence of miR-181b-5p has been identified, only in BC EVs, which regulates GSK3β interaction protein (GSKIP), which has the function of inactivating GSK-3β. The effects of EV was appreciated in an *in vivo* *Leishmania major* infection model. In BALB/c animals with tumor induction and treated with EVs was possible to identify the modulation of the immune response to the infection, by observing a lower inflammatory infiltrate of cells responsible for mediating local immune response against the parasite, in addition to a strong Th2 response, greater injury, combined with greater tumor growth, when compared to the control group of *L. major* infection and tumor control group. **Conclusion:** Specific EVs of breast cancer patients modulate, through miR-181b, the inactivation of GSK-3β in DCs. This modulation promotes phenotypic and functional changes in Mo-DCs, inducing a suppressive state of the adaptive immune response.

Key-words: dendritic cell, extracellular vesicles, breast cancer, miR-181b-5p, GSK-3β.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ARF6	<i>ADP Ribosylation Factor 6</i> (fator de ribosilação ADP 6)
BC	<i>Breast cancer</i> (câncer de mama)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CDIS	<i>Carcinoma Ductal In situ</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> (Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster)
CEFAP	Centro de Facilidade de Apoio a Pesquisa – USP/SP
CLIS	<i>Carcinoma lobular in situ</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> (Linfócitos T citotóxicos)
CT	<i>Control</i> (controle)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i> (Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos)
DC	<i>Dendritic cell</i> (Célula Dendrítica)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DS	Doador saudável
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Receptor de estrógeno)
EV/EVs	<i>Extravesicular vesicles</i> (Vesículas extracelulares)
Exo (s)	<i>Exosomes</i> (Exossomo(s))
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12</i> (proteína 12 de ligação à FK506)
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i> (Fator de transcrição “ <i>forkhead box</i> ” P3)
GAP	<i>GTPase-accelerating proteins</i> (proteína ativadora de GTPase)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago)
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> (proteína glicogênio sintase quinase-3 β)
GSKIP	<i>GSK3B Interacting Protein</i> (proteína de interação a GSK-3 β)

HD	<i>Healthy donor</i> (doador saudável)
Her2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> (Receptor de fator de crescimento epidérmico 2)
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen- D Related</i> (Antígeno Leucocitário Humano DR/MHC classe II)
HSP	<i>Heat shock proteins</i> (proteínas do choque térmico)
Iarc	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
iDC	<i>Immature Dendritic Cells</i> (Células dendríticas imaturas)
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> (Indoleamina - 2,3 dioxigenase)
IgG	<i>Immunoglobulin G</i> (Imunoglobulina G)
sIgM	<i>Secreted IgM</i> (IgM secretada)
LLC	Leucemia linfocítica crônica
ILVs	<i>Intraluminal vesicles</i> (Vesículas intraluminais)
IM	<i>Inflammatory mediators</i> (mediadores inflamatórios)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> (fator de crescimento da c-Jun c- terminal N-quinase)
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
mDCs	<i>Mature Dendritic Cells</i> (Células dendríticas maduras)
MDSCs	Células supressoras de origem mielóide
MEF2C-β	<i>Myocyte enhancer factor 2</i> (Fator potenciador de miócitos 2-beta)
MET	<i>Transmission electronic microscopy</i> (Microscopia eletônica de transmissão)
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i> (Intensidade Mediana de Fluorescência)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MIF	<i>Migration inhibitory factor</i> (Fator inibidor da migração)
miRNAs	MicroRNAs
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i> (Reação mista de linfócitos)

mRNAs	RNAs mensageiros
mTOR	Sensor de nutrientes celular mecanístico da rapamicina
MMP – 9	Metaloproteinase de matriz 9
Mo-DC(s)	Célula(s) dendrítica(s) diferenciada(s) <i>in vitro</i> a partir de monócito(s)
MVBs	<i>Multivesicular bodies</i> (Corpos multivesiculares)
NF-kB	fator nuclear kappa da cadeia leve das células B ativadas
NK	<i>Natural Killer</i> (células NK)
NPC	Carcinoma nasofaríngeo
n-SMase	ceramida dependente de esfingomielinase neutra
NST	subtipo não especial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM50	Assinatura de expressão de 50 genes
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células mononucleadas do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PD-1	Proteína 1 de morte celular programada
PD-L1	Ligante à proteína 1 de morte celular programada
PDACs	Adenocarcinomas ductais pancreáticos
PDCD6IP	proteína de interação de morte celular programada-6
PKD1	Proteína quinase 1 dependente de fosfoinositida
PDL2	fosfolipase D2
PIP2	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PIP3	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
piRNA	RNA interativo Piwi
PR	<i>Progesterone receptor</i> (Receptor de progesterona)
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> (Receptor de reconhecimento de padrões)
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido-sintase 2
RFXAP	proteína associada ao fator regulador X
Rheb	homólogo de SRA enriquecido no cérebro
RNAs	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (Meio Roswell Park Memorial Institute)
Ser	Serina
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro fetal bovino
Sin1	Proteína 1 de interação com MAP-quinase ativada por estresse
siRNAs	RNA interferente pequeno
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (sinal de tradução e ativador da transcrição)
TADCs	Células dendríticas associadas a tumores
TAMs	<i>Tumor-associated macrophages</i> (macrófagos associados a tumores)
TBST	<i>Tris-buffered saline Tween</i> (Tampão Tris-Salina com Tween 20)
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor de células T)
TGF	Fator de crescimento transformador β
Th	<i>T helper</i> , Células T auxiliares
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
Treg	Linfócitos T reguladores
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TSC	complexo proteico supressor de tumor da esclerose tuberosa
uSFB	Soro fetal bovino ultracentrifugado
WT	<i>Wilde type</i> (Tipo selvagem)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características do câncer por Hanahan e Weinberg no ano de 2000..	20
Figura 2 - Características do câncer no panorama de 2011..	21
Figura 3 - Classificação dos tipos de câncer de mama. .	24
Figura 4 - Imunoedição de tumores..	27
Figura 5 - Moléculas coestimulatórias e seus ligantes - visão geral..	33
Figura 6 - Ilustração esquemática da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR/NFκB..	39
Figura 7 - Desenho experimental da avaliação da influência de vesículas extracelulares na diferenciação de Mo-DCs.	58
Figura 8 - Dot plot representativo da separação de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ humanos no FACSaria II (BD).....	60
Figura 9 - Desenho experimental da o ensaio funcional das Mo-DCs geradas na presença e ausência de vesículas extracelulares.	61
Figura 10 - Esquema representativo dos experimentos <i>in vivo</i>	71
Figura 11 - Vesículas extracelulares isoladas possuem forma, tamanho e presença de marcadores relacionados aos exossomos (pequenas vesículas).	74
Figura 12 - Imunofenotipagem de Mo-DCs por citometria de fluxo. <i>Dot plots</i> representativos da estratégia de análise utilizada.....	78
Figura 13 - EVs de pacientes com câncer de mama diminuem a expressão dos marcadores de superfície das Mo-DCs..	79
Figura 14 - Análise da proliferação de linfócitos T alógenos em co-cultura com Mo-DCs por citometria de fluxo.	82
Figura 15 - Caracterização dos linfócitos em co-cultura com Mo-DCs.	83
Figura 16 - Análise da reprodutibilidade dos efeitos observados no ensaio funcional gerando Mo-DCs de diferentes monócitos saudáveis.....	85
Figura 17 - Produção de citocinas por células T em co-cultura com Mo-DCs.....	86
Figura 18 - EVs de pacientes modulam a liberação de citocinas no sobrenadante para um perfil anti-inflamatório na co-cultura.....	87
Figura 19 - Análise da sinalização NF-Kb e mTOR por Western Blotting.	94
Figura 20 - Estratégia utilizada para delimitação de miRNAs a serem detectados em vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis.....	98
Figura 21 - EVs isoladas do sobrenadante de células tumorais de mama diminuem a expressão dos marcadores de superfície das Mo-DCs.....	105
Figura 22 - Caracterização dos linfócitos em co-cultura com Mo-DCs	106
Figura 23 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células mielóides.	107
Figura 24 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células linfóides.....	108
Figura 25 - Análise de células imunes presentes no baço de animais tratados ou não com EVs.	109
Figura 26 - Análise macroscópica da lesão por <i>L. major</i> e tumor induzido por 4T1.	111
Figura 27 - Quantificação de parâmetros mensurados no ensaio <i>in vivo</i>	112
Figura 28 - Análise de células mielóides nas orelhas de animais infectados com <i>L. major</i> ..	114
Figura 29 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células linfóides.....	115

Figura 30 - Análise de células linfoides nas orelhas de animais infectados com <i>L. major</i> ..	116
Figura 31 - Resumo gráfico da tese.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos Anticorpos utilizados para avaliação de proliferação celular e caracterização do ensaio funcional de proliferação de linfócitos alogênicos	61
Tabela 2 - Detalhamento das sequencia e concentrações dos primers utilizados no ensaio de qPCR.....	64
Tabela 3 - Informações das amostras de doadores saudáveis e pacientes com câncer utilizadas nos ensaios.	72
Tabela 4 - Resumo das citocinas produzidas por células T CD4, CD8 e reguladoras no MLR e correlação com as detectadas no sobrenadante de cultura.	88
Tabela 5 - Efeitos de citocinas no microambiente do câncer de mama	89
Tabela 6 - Busca na literatura de miRNAs validados como superexpressos no plasma ou sangue de pacientes com câncer de mama.....	99

SUMÁRIO

<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>xiii</i>
<i>Lista de tabelas</i>	<i>xiv</i>
1. Introdução.....	19
1.1 Neoplasia e características tumorais	19
1.2 Câncer de mama	22
1.3 Interações entre câncer e sistema imune	25
1.4 Células dendríticas	31
1.4.1 Definição e fenótipos.....	31
1.4.2 Papel das células dendríticas no câncer de mama	36
1.4.3 Sinalização de mTOR na diferenciação e ativação de células dendríticas	37
1.4.3.1 Visão geral.....	37
1.4.3.2 Mecanismos moleculares da ativação de mTORC1 e mTORC2	38
1.6 Comunicação intercelular através de vesículas extracelulares.....	42
1.6.1 Tipos de vesículas extracelulares	42
1.6.2 Vesículas extracelulares no contexto tumoral	45
1.6.2.1 EVs como medida de ataque ao sistema imune.....	46
1.6.2.2 EVs como mecanismo de escape tumoral	47
1.6.3 miRNAs como moléculas de comunicação celular carregados por vesículas extracelulares	50
2. Objetivos.....	52
2.1 Objetivo geral.....	52
2.2 Objetivos específicos.....	52
3. Metodologia.....	53
3.1 Amostras biológicas	53
3.1.1 Doadores saudáveis	53

3.1.2 Pacientes com carcinoma ductal invasivo	53
3.3 Obtenção e quantificação dos exossomos	54
3.3.1 Isolamento a partir do plasma.....	54
3.3.2 Isolamento a partir do sobrenadante de cultura celular	54
3.4 Caracterização das vesículas extracelulares	55
3.4.1 <i>Western Blot</i>	55
3.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	56
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	56
3.5 Influência dos exossomos na diferenciação de Mo-DCs	56
3.5.1 Processamento de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) para obtenção de monócitos	56
3.5.2 Diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DCs)	57
3.5.3 Análise fenotípica por citometria de fluxo	58
3.6 Ensaio funcional das Mo-DCs geradas	59
3.6.1 Separação de linfócitos T alogênicos	59
3.6.2 Análise do perfil resposta imune adaptativa induzida e proliferação de linfócitos .	60
3.6.3 Análise na interferência de doador de monócito para geração de Mo-DCs e defeitos funcionais gerados	62
3.7 Detecção da produção de citocinas em sobrenadante de cultura	62
3.8 Avaliação de vias de sinalização mTOR e NF-kB após maturação das Mo-DCs geradas <i>in vitro</i>	63
3.9 Avaliação de miRNAs em vesículas extracelulares.....	63
3.9.1 Levantamento bibliográfico de miRNAs relacionados com câncer de mama e possíveis alvos	63
3.9.2 Isolamento de miRNAs de vesículas extracelulares.....	63
3.9.3 Conversão do miRNA em cDNA e reação de qPCR.....	64
3.10 Avaliação da modulação do fenotípica de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de cultura de células tumorais humanas.....	65

3.11 Avaliação da modulação sistêmica da resposta imune por vesículas extracelulares tumorais <i>in vivo</i>	66
3.11.1 Animais.....	66
3.11.2 Isolamento de EVs do sobrenadante de cultura de células 4T1	66
3.11.3 Avaliação do fenótipo de células dendríticas e macrófagos no baço após injeção de EVs de 4T1	66
3.11.4 Indução de Carcinoma mamário murino 4T1	67
3.11.5 Obtenção de <i>Leishmania major</i>	67
3.11.6 Infecção dos animais com <i>L. major</i>	68
3.11.7 Quantificação dos parasitos	68
3.11.8 Análise do infiltrado inflamatório nas orelhas infectadas por citometria de fluxo	69
3.11.9 Dosagem da atividade da enzima arginase	70
3.11.10 Grupos experimentais e visão geral do ensaio <i>in vivo</i>	70
3.12 Análise estatística	71
4. Resultados e Discussão.....	71
4.1 Caracterização das amostras biológicas obtidas.....	71
4.2 Caracterização das vesículas extracelulares isoladas do plasma e sobrenadante de cultura	73
4.2 Análise fenotípica das Mo-DCs diferenciadas <i>in vitro</i> na ausência e presença de EVs	77
4.3 Análise funcional das Mo-DCs diferenciadas <i>in vitro</i> na ausência e presença de EVs .	81
4.3.1 Avaliação da indução de resposta imune adaptativa e fenótipo celular dos linfócitos	82
4.3.2 Validação dos efeitos observados utilizando monócitos saudáveis de indivíduos diferentes para geração de Mo-DCs	85
4.3.3 Identificação de citocinas no ensaio funcional de Mo-DCs	86
4.4 Análise da alteração das vias de maturação das Mo-DCs diferenciadas <i>in vitro</i> na presença de EVs	91

4.5	Análise de miRNAs presentes em EVs de pacientes com câncer de mama capazes de modular componentes celulares em Mo-DCs	97
4.6	Análise da influência de EVs isoladas de sobrenadante de cultura celular de células tumorais em Mo-DCs	104
4.7	Avaliação da modulação do fenótipo de células imunes por EVs tumorais <i>in vivo</i>	107
4.8	Avaliação da resposta imunológica <i>in vivo</i> à <i>Leishmania major</i> em animais com câncer de mama induzido e tratado com EVs de células tumorais de mama murina	110
5.	Considerações finais	118
6.	REFERÊNCIAS	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasia e características tumorais

O câncer surge por um processo, já descrito há anos, envolvendo múltiplas etapas que culminam na transformação de células normais em células malignas e envolve processos de hiperplasia, alterações pré-malignas e tumor *in situ* (Beckmann et al., 1997). A neoplasia maligna, também chamada de câncer, é o nome dado a um conjunto de diferentes tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (INCA, 2020).

Existem mais de 100 tipos de cânceres já descritos, sendo que estes podem ser divididos em dois grandes grupos: sólidos ou hematológicos (não sólidos). O tumor sólido é caracterizado por uma massa anormal de tecido que geralmente não contém cistos ou áreas líquidas. Os diferentes tipos de tumores sólidos são nomeados de acordo com o tipo celular que o forma. Como exemplo de tumores sólidos pode-se citar os sarcomas, carcinomas e linfomas. As leucemias são caracterizadas como um tipo de tumor hematológico e geralmente não formam tumores sólidos (INCA, 2020, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/solid-tumor>, acesso em 28/06/2020). Apesar da necessidade de classificação dos diferentes tipos de câncer, devido a complexidade de localização, ontogenia celular e particularidades, as células tumorais possuem algumas características básicas em comum, definindo-as (Hanahan and Weinberg, 2000).

A complexidade intracelular entre as células tumorais não é recente e já foi descrita por Peter Nowell em 1976. Nesta teoria, Peter Nowell atribuiu a capacidade evolutiva de seleção intracelular, através de mutações somáticas, a fim de selecionar clones com maior capacidade proliferativa, angiogênica e invasora (Greaves, 2015; Nowell, 1976). Essa seleção natural explica o processo de carcinogênese e a resistência terapêutica adquirida em protocolos de tratamentos tumorais (Greaves and Maley, 2012). Anos após, em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis características comuns do câncer: manutenção dos sinais proliferativos, evasão de supressores de crescimento, ativação e indução de invasão e metástase, indução de angiogênese, imortalidade replicativa e resistência a morte celular (Figura 1). Juntas, essas características demonstram o alto nível de organização do tumor e permitem uma melhor compreensão da versatilidade das neoplasias (Hanahan and Weinberg, 2000).

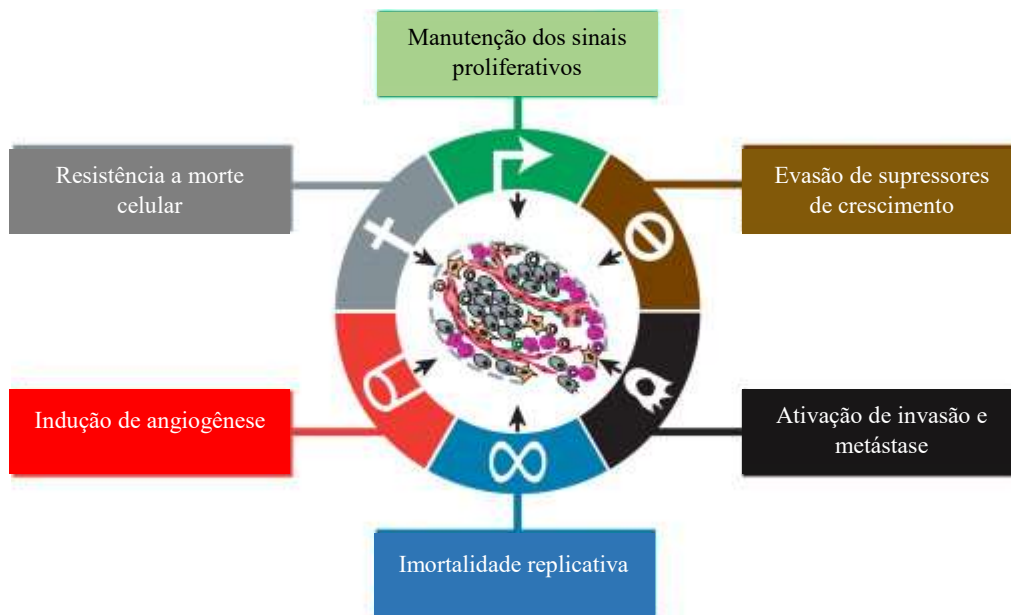


Figura 1 - Características do câncer por Hanahan e Weinberg no ano de 2000. A figura demonstra algumas capacidades biológicas adquiridas por uma célula ao longo do desenvolvimento do tumor. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Porém, o câncer é um tecido complexo constituído por diferentes clones tumorais que se comunicam entre si e com células do estroma, sendo formado pelos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e células imunes. Dentre os tipos de células imunológicas que podem ser encontradas em um tumor, inclui-se os macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células *natural killer* (NK), linfócitos nativos e de memória, células B e células T efetoras incluindo vários subconjuntos de células T: células T auxiliares do tipo 1 (Th1), células Th2, células Th17, células T reguladoras (Treg), células T auxiliares foliculares (T_{FH}) e células T citotóxicas. A análise da localização (centro, margem invasiva ou em estruturas linfoides terciárias adjacentes), densidade e orientação funcional, seja com polarização em um estado pró ou anti-inflamatório (“contexto imune”) das diferentes populações de células imunes pode permitir a identificação de componentes que favorecem um bom ou mau prognóstico ao paciente (Coussens and Werb, 2002; Fillon, 2018; Fridman et al., 2012; Galon et al., 2007; Smith and Kang, 2013; Taniguchi and Karin, 2018; Zamarron and Chen, 2011). Em conjunto, tais células são participantes ativas na tumorigênese e podem contribuir para o desenvolvimento e estabelecimento tumoral. (Gandellini et al., 2015).

O microambiente tumoral está em constante evolução através do remodelamento tecidual, alterações metabólicas no tumor e alterações no recrutamento de células estromais, incluindo uma diversidade de células imunes (Swartz et al., 2012). Como, por exemplo, pode-se citar o trabalho de Borges e Schedin o qual descreveu que a remodelação tecidual, presente

na mama pós-parto, durante a involução da glândula mamária, aumenta os riscos de desenvolvimento de câncer de mama (Borges and Schedin, 2012). Koehne e Dubois descreveram como o remodelamento tecidual no microambiente de câncer colorretal cria um ambiente inflamatório indutor de tumor semelhante ao ambiente de uma ferida. Este processo é caracterizado por um influxo de T-helper, macrófagos do tipo 2, colágeno fibrilar abundante e aumento da atividade da cicloxigenase 2 (Koehne and Dubois, 2004).

Portanto, houve uma necessidade de expansão das características tumorais propostas por Hanahan and Weinberg em 2000, a fim de considerar a comunicação entre o tumor e o microambiente tumoral (estroma) que, de fato, contribuem com a tumorigênese (Figura 2).

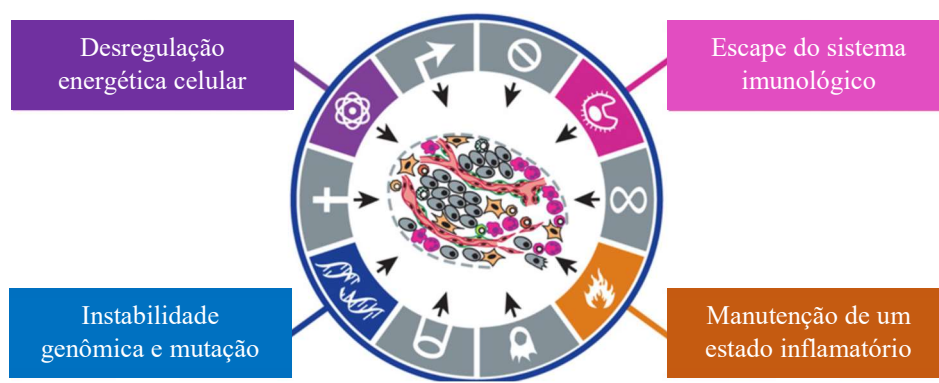


Figura 2 - Características do câncer no panorama de 2011. Inclusão de “marcas” emergentes e características de ativação. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Dentre as características incluídas no diagrama proposto por Hanahan e Weinberg (2011) temos a reprogramação do metabolismo energético celular, que aumenta os processos catabólicos, por exemplo, a fim de intensificar o crescimento e proliferação celular de forma contínua (McDonald et al., 2017; Pon and Marra, 2015; Semenza, 2008; Yen et al., 2010). A segunda característica adicional envolve a evasão ativa do ataque e destruição por células do sistema imunológico, uma vez que componentes do sistema imune inato e adaptativo são capazes de eliminar células tumorais e impedir a progressão de neoplasias incipientes e micrometástases (Koebel et al., 2007). Esta capacidade evasiva é adquirida através das outras características descritas: instabilidade genômica e manutenção de um estado inflamatório pelo tumor, envolvendo um processo de múltiplas etapas.

Neste contexto, o estabelecimento do câncer é facilitado em processos de inflamação crônica, que geralmente causam danos genéticos por meio da produção de compostos oxidantes, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses produtos podem induzir a formação e o acúmulo de lesões de DNA desestabilizadoras, mutagênicas, tóxicas e/ou

genômicas (Federico et al., 2007). A sinalização relacionada à inflamação também mostrou suprimir a atividade do sistema de reparo celular de danos no DNA (Hussain et al., 2003). Por exemplo, os neutrófilos, a principal fonte de espécies reativas de oxigênio, podem inibir o reparo por excisão de bases de DNA (Gungor et al., 2007). e a citocina anti-inflamatória IL-10, pode suprimir a atividade da resposta inflamatória ao dano no DNA (Sato et al., 2006). A inflamação no sítio tumoral também pode ser promovida devido à morte necrótica de células tumorais sujeitas a um suprimento ineficiente de sangue, devido à alta taxa de crescimento. Essa inflamação promovida já tem sido descrita como um dos principais propulsores da progressão maligna em tumores sólidos (Singh et al., 2017).

Portanto, todas essas alterações genéticas descritas acima, esquematizadas na figura 2, promovem seleção evolutiva de clones tumorais e favorecem o seu estabelecimento (Drake et al., 2006; Seliger, 2016).

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é um exemplo de tumor sólido, predominantemente do tipo adenocarcinoma (95% dos casos), originado a partir da alteração de células epiteliais do mamilo, ducto ou dos lóbulos da mama (Makki, 2015). O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres em todo o mundo e é curável em 70 a 80% das pacientes com doença não metastática em estágio inicial. Porém, em fase avançada com metástases em outros órgãos é considerado incurável com as terapias atualmente disponíveis (Harbeck et al., 2019). No Brasil, após o cancer de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo mais comum em mulheres (representando cerca de 30% dos casos novos), seguido pelo de cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,2%) e traqueia, brônquio e pulmão (5,6%) (INCA, 2020). O câncer de mama também acomete homens, sendo, no entanto, cerca de 100 vezes mais comum em mulheres (Makki, 2015). As elevadas taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil se devem ao diagnóstico tardio da doença, o que diminui as chances de cura (INCA, 2020).

O câncer de mama possui classificação extensa e pode ser realizada de maneiras distintas, considerando-se análises morfológicas e moleculares (Makki, 2015). Os carcinomas podem ser classificados de acordo com a localização da proliferação de células anormais na glândula mamária (ducto ou lóbulo) e seu poder de infiltração. Assim, os carcinomas ductal *in situ* (CDIS) e lobular *in situ* (CLIS) são os tipos de câncer de mama não invasivos mais comuns, em que há uma proliferação localizada de células neoplásicas nos ductos e lóbulos na glândula mamária, respectivamente (INCA, 2018; Oncoguia da Organização Mundial da Saúde, 2015).

O carcinoma ductal invasivo é o tumor maligno de mama mais comum, representando 80% dos casos. Ele se localiza inicialmente nos ductos e se infiltra no estroma do tecido adiposo adjacente. Possui, portanto, caráter invasivo, podendo estabelecer metástase através do sistema linfático e sanguíneo. O carcinoma lobular invasivo se inicia nos lóbulos e corresponde a 10% dos tipos de cânceres de mama invasivos. Além disso, alguns tipos de tumores malignos podem ser classificados na forma mista, em que são compostos por mais de uma das classificações morfológicas descritas acima. Existem tipos raros de neoplasias na mama, como o câncer de mama inflamatório, doença de Paget, tumor filóide e angiossarcoma, que representam cerca de 1 a 3% das neoplasias mamárias (INCA, 2020; Oncoguia da Organização Mundial da Saúde, 2015).

Na última década, têm-se aumentado os esforços para complementar a classificação morfológica dos carcinomas da mama com parâmetros moleculares que possam proporcionar uma apreciação mais clara da heterogeneidade do câncer de mama e estabelecimento de melhores estratégias terapêuticas. Perou e colaboradores (2000) classificaram os tipos de câncer de mama em 4 subgrupos distintos com base nos perfis de expressão gênica: luminal A e luminal B [expressando o receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR)]; receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 enriquecido (HER2) e *basal-like* (sem expressão de ER, PR e HER2) (Perou et al., 2000). Essa classificação mudou o tratamento clínico do câncer de mama e na maneira de se basear a classificação tumoral por abordagens centradas apenas nas características histológicas, conferindo uma maior eficácia ao tratamento (Langlands et al., 2013).

Atualmente, a prática clínica normalmente usa uma classificação substituta de cinco subtipos com base nas características histológicas e moleculares (Figura 3). Os tumores que expressam ER e/ou PR são considerados cânceres de mama positivos para receptores hormonais, enquanto tumores que não expressam ER, PR ou HER2 são cânceres de mama triplo negativo (TNBC). É importante ressaltar que o tratamento do paciente por uma equipe multidisciplinar especializada melhora a sobrevida e a qualidade de vida de pacientes com câncer de mama precoce e metastático, assim como o tratamento seguindo as diretrizes de alta qualidade (Harbeck et al., 2019). Além disso, terapias adotadas podem ser direcionadas de acordo com o perfil molecular das células tumorais, conferindo uma maior eficácia no tratamento (Langlands et al., 2013).

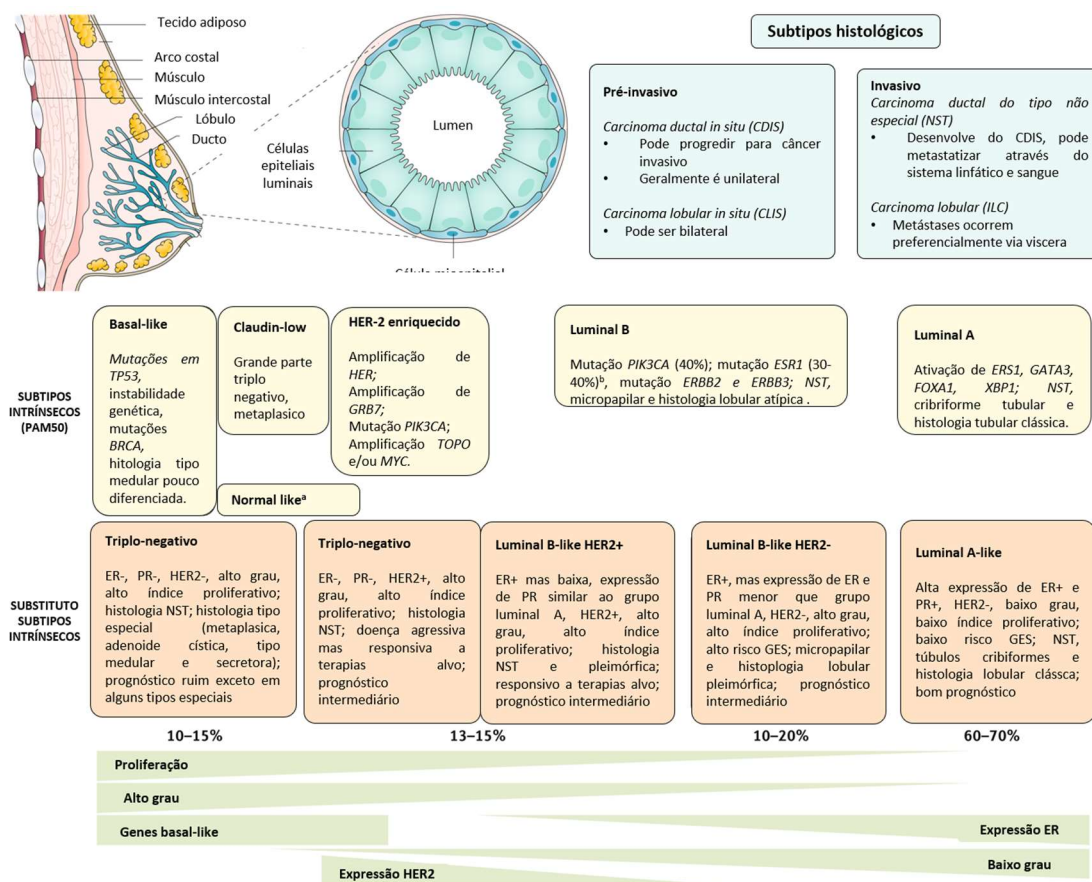


Figura 3 - Classificação dos tipos de câncer de mama. Todos os cânceres de mama surgem nas unidades lobulares do ducto terminal (a unidade funcional da mama) do ducto coletor. Os subtipos histológicos descritos aqui (canto superior direito) são os subtipos mais frequentes de câncer de mama; carcinoma ductal (agora referido como 'nenhum tipo especial' (NST)) e carcinoma lobular são as lesões invasivas; suas contrapartes pré-invasivas são carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS), respectivamente. Os subtipos intrínsecos de Perou e Sorlie (Perou et al., 2000) são baseados em uma assinatura de expressão de 50 genes (PAM50) (Cheang et al., 2015). Os subtipos intrínsecos substitutos são usados clinicamente e baseiam-se na expressão histológica e imunohistoquímica de proteínas-chave: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e o índice de proliferação. Os tumores que expressam ER e/ou PR são denominados "receptores hormonais positivos"; tumores que não expressam ER, PR e HER2 são chamados de "triplo-negativos". O posicionamento relativo das caixas está alinhado com as características (por exemplo, proliferação e classificação) em verde. - negativo; + positivo. GES, assinatura de expressão gênica. ^aartefato; expressão de componentes mamários normais devido à baixa celularidade do tumor ^bmutações de *ESR1* induzidas por terapia direcionada a inibidores da aromatase. Fonte: adaptado de Harbeck et al. 2019.

Embora existam diferentes opções de tratamento disponíveis para o câncer de mama (Harbeck et al., 2019), o enorme potencial da imunoterapia no tratamento do câncer de mama localizado e metastático está sendo atualmente explorado. Existem lacunas significativas no entendimento das interações complexas entre o sistema imunológico e o câncer de mama, uma vez que o sistema imunológico tem sido descrito por ser pró-tumorigênico e anti-tumorigênico, dependendo das células envolvidas e das condições do microambiente do tumor (Edechi et al., 2019).

1.3 Interações entre câncer e sistema imune

A associação do câncer e inflamação é antiga e já foi descrita em 1863 por Rudolf Virchow que, em seus experimentos, notou um grande infiltrado de linfócitos em tecidos neoplásicos e sugeriu o estabelecimento tumoral em sítios de inflamação crônica (Balkwill and Mantovani, 2001). Dvorak e colaboradores em 1986 identificaram e descreveram o microambiente tumoral como um ambiente densamente infiltrado por células do sistema inato e adaptativo (Dvorak, 1986).

Os primeiros indícios da atuação de componentes do sistema imunológico em tumores foram propostos por Willian Coley em 1891 (Coley, 1891). Em seus ensaios foram introduzidos microorganismos do gênero *Streptococcus* em tumores de pacientes com sarcoma. Em suas observações, ele observou uma remissão do tumor, chegando até ao seu desaparecimento, devido ao “ataque” por células do sistema imunológico (Coley, 1891). Anos após, Paul Ehrlich em 1909 postulou a ideia de que o sistema imunológico poderia reconhecer células tumorais de forma semelhante ao reconhecimento de patógenos microbianos (Ehrlich, 1909). Assimilando todas as observações experimentais da época, Burnet, em 1970, descreveu o conceito de vigilância imunológica (Burnet, 1970). O conceito baseia-se no monitoramento constante dos tecidos por células do sistema imune para a identificação de antígenos tumorais ou moléculas capazes de induzir rejeição de tumores nascentes (Mittal et al., 2014; Wang and Wang, 2017). Porém, na época o conceito de vigilância imunológica não teve ampla aceitação, uma vez que camundongos *Nude* (que não possuem timo, portanto, são imunocomprometidos) não apresentaram maiores taxas de desenvolvimento de tumores quando comparados aos imunocompetentes (Shankaran et al., 2001).

Por outro lado, atualmente está bem estabelecido que a inflamação induzida por patógenos é um fator de alto risco para o câncer. Por exemplo, a persistente infecção por *Helicobacter pylori* está altamente associada ao adenocarcinoma e linfoma gástrico (Zeng et al., 2015), a infecção pelo vírus do papiloma humano aumenta o risco de câncer do colo do útero (Schiffman et al., 2007), as infecções pelos vírus da hepatite B e C aumentam a incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) (Grivennikov et al., 2010), e a infecção pelo vírus Epstein-Barr está intimamente relacionada ao carcinoma nasofaríngeo (Chua et al., 2016). Em comum, esses agentes infecciosos causadores levam a infecções persistentes associadas a baixos níveis de inflamação crônica. Além disso, algumas doenças autoimunes também se correlacionam com o desenvolvimento do câncer. A doença de Crohn e a colite ulcerativa, também conhecidas como doenças inflamatórias intestinais, estão altamente associadas a um risco aumentado de

câncer colorretal (CRC) (Jess et al., 2012). A obesidade também induz inflamação promotora de tumores (Yang et al., 2015).

A maioria das malignidades sólidas desencadeia uma resposta inflamatória intrínseca que cria um microambiente pró-tumorigênico (Sica et al., 2008). Além da proliferação autônoma de células, certos oncogenes, como *RAS* e os membros da família *MYC*, induzem um programa transcricional que leva à remodelação do microambiente tumoral através do recrutamento de leucócitos, à expressão de quimiocinas e citocinas promotoras de tumor e à indução angiogênica (Soucek et al., 2007; Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Durante o processo de crescimento do tumor, células tumorais não recebem suprimento sanguíneo necessário e se tornam privadas de oxigênio e nutrientes. Isso resulta na morte celular necrótica no núcleo do tumor e na liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 e HMGB1, por exemplo (Vakkila and Lotze, 2004). A resposta inflamatória resultante promove a neoangiogênese e fornece às células tumorais sobreviventes fatores adicionais de crescimento, produzidos por células inflamatórias e imunológicas recém-recrutadas (Karin, 2006).

Além disso, uma forte resposta inflamatória associada ao tumor pode ser iniciada através de processos de terapia do câncer. A radiação e a quimioterapia, por exemplo, causam morte necrótica maciça de células tumorais e tecidos circundantes, o que, por sua vez, desencadeia uma reação inflamatória análoga a uma resposta de cicatrização de feridas (Zong and Thompson, 2006). O resultado final da inflamação induzida é controverso, pois, por um lado, pode melhorar a apresentação cruzada de antígenos tumorais e a subsequente indução de uma resposta imune antitumoral (Zitvogel et al., 2008), bem como pode-se observar um efeito de indução tumoral, tendo-se uma necrose seguida de um rápido crescimento do tumor (Ammirante et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Vakkila and Lotze, 2004).

A fim de explicar tais eventos da interação entre sistema imune e câncer tem-se o conceito de que a iniciação e progressão do tumor são finamente imunoeditadas (Matsushita et al., 2012). A imunoedição do tumor é dividida em três fases (Figura 4): eliminação, equilíbrio e escape (Kim et al., 2007).

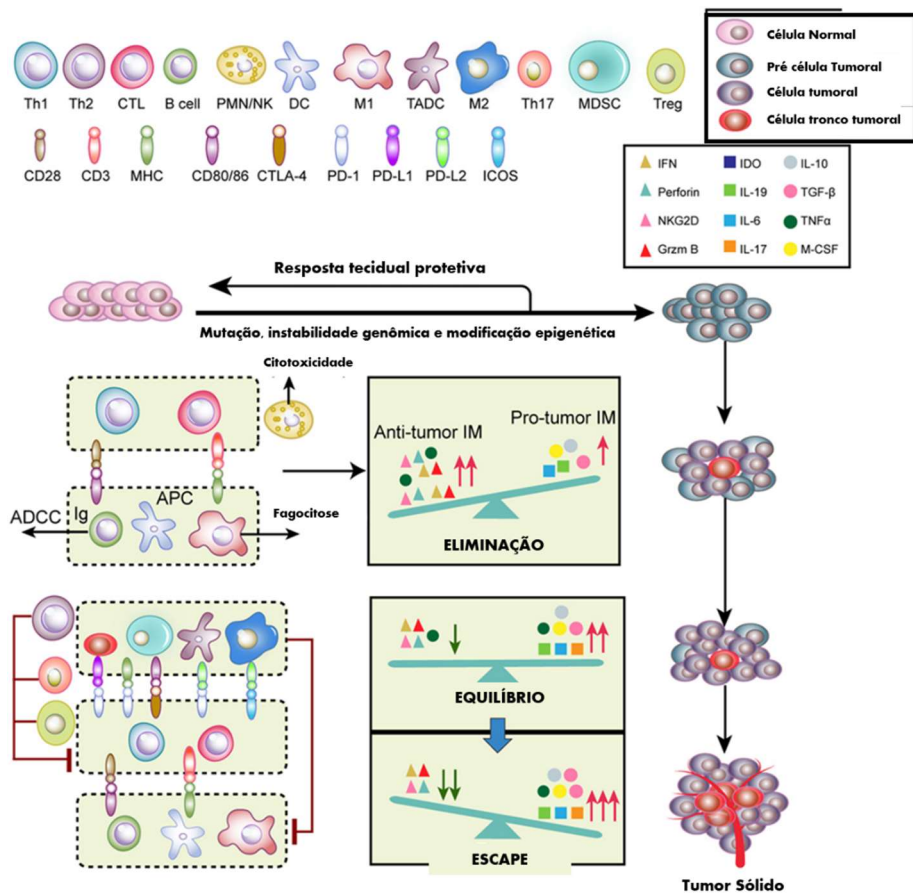


Figura 4 - Imunoedi a o de tumores. As células normais são transformadas em células malignas por muta es, instabilidade genômica e modifica o epigenética, durante as quais as imunidades inata e adaptativa regulam o microambiente do tumor. Na fase de elimina o, a imunidade inata e a adaptativa detectam e eliminam sinergicamente as células tumorais precoces. Em seguida, células tumorais raras que não são eliminadas na fase de elimina o podem entrar na fase de equilíbrio, onde são controlados o crescimento e a elimina o. Finalmente, as variantes restantes das células tumorais com fraca imunogenicidade escapam da vigilância imunológica para formar uma neoplasia clinicamente aparente. IM: do inglês inflammatory mediators, em portugês, mediadores inflamatórios. Fonte: adaptado de Zhang et al. 2017.

Durante a fase de elimina o, as células tumorais imunogênicas são identificadas e removidas por células e mediadores efetores da resposta imune antes de se tornarem clinicamente detectáveis. As células NK ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), bem como quimiocinas e mediadores efetores, como grânulos citotóxicos contendo perforinas e granzimas. A citocina IFN- γ , por exemplo,   uma citocina pluripotente descoberta como parte de uma família maior de fatores – os interferons.   um membro solitário dos interferons do tipo II podendo ser produzida por várias células imunes inatas e adaptativas em resposta aos estímulos associados   patógenos ou ao dano celular (Mojic et al., 2017). O IFN- γ se liga ao receptor de IFN- γ (IFNGR), expresso na superfície de quase todos os tipos de células. Na sinaliza o can nica de IFN- γ , a liga o de IFN- γ ao seu receptor causa oligomeriza o das subunidades do receptor IFN γ R1 e IFN γ R2

e ativação das quinases JAK1 e JAK2 que, por sua vez, ativam STAT1 e STAT3. A ativação de diferentes genes responsivos a IFN- γ ocorre em sinergia com diferentes vias de sinalização, como, por exemplo, MAP cinase e NF- κ B (Gough et al., 2008; Wang et al., 2013a). Como resposta antitumoral, o IFN- γ estimula a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) [que será abordada em tópicos à frente] em células tumorais aumentando a susceptibilidade de reconhecimento das mesmas por células imunes (Martini et al., 2010). Além disso, o IFN- γ também exibe atividade antitumoral através da regulação positiva das moléculas p21 e p27, que interrompem o ciclo celular ou mediam a morte celular pela via apoptótica (Chawla-Sarkar et al., 2003; Chin et al., 1996). TNF- α , por sua vez, foi primeiramente identificado em 1975 e recebeu a nomenclatura devido a sua capacidade de induzir a necrose de sarcomas induzidos por metilcololanteno transplantado em camundongos, quando injetado em alta concentração nos tumores (Carswell et al., 1975). Posteriormente, esse fenômeno foi relacionado à capacidade do TNF de desencadear apoptose das células endoteliais do tumor através da sua ligação ao TNFR1, promovendo ativação de caspase 8 (Huang et al., 2015; Robaye et al., 1991).

Os macrófagos em seu fenótipo inflamarório também possuem a capacidade de produzirem citocinas inflamatórias, como IL-12 e IFN- γ . Ambas podem atuar na eliminação de células tumorais ao iniciar respostas citotóxicas (Kim et al., 2007). A citocina IL-12 tem um papel fundamental na regulação da inflamação, interligando respostas imunes inatas e adaptativas. A liberação de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação e proliferação subsequentes de células NK e células Th1, promovendo suas funções efetoras (Aste-Amezaga et al., 1994; Salcedo et al., 1993; Tugues et al., 2015).

Um dos principais mecanismos utilizados pelas células imunes para eliminar as células tumorais é o reconhecimento por linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Após o encontro inicial com antígenos, apresentados por APCs, as células T CD8⁺ se tornam ativadas e desempenham funções especializadas (Clark, 2018). Além disso, a diferenciação celular em células ativadas é influenciada pela produção de citocinas e sinais coestimulatórios das APCs e presença de citocinas extracelulares (Slaney et al., 2014); além de fatores metabólicos, epigenéticos e transcricionais (Cairns et al., 2011; Mellor and Munn, 2008). Após ativação celular, as células CD8⁺ induzem a morte do tumor através de receptores de morte ou através da exocitose de grânulos. Nestes grânulos, proteases são liberadas na sinapse imune, atravessam a membrana celular alvo através de poros perfurantes e finalmente induzem a apoptose, clivando seus vários

substratos. (Hoves et al., 2012). Durante a morte dependente de granzimas, a morte celular alvo é rápida e eficiente, sendo mediada por várias granzimas que atuam através de vias de morte celular redundantes (Cullen et al., 2010).

Durante esta fase de eliminação de clones tumorais, as variantes que sobreviveram à fase de eliminação sofrem várias mutações podendo, por exemplo, exibir um fenótipo imunogênico fraco pela perda de peptídeos antigênicos de tumor ou adquirir a capacidade de reduzir a expressão de importantes componentes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Zhang et al., 2017). Essa fase pode durar vários anos até que surjam clones tumorais resistentes à resposta imune e maior probabilidade de escapar da imunovigilância (Kim et al., 2007). Nesse cenário, tem-se a iniciação de um estado pró-tumoral em maiores proporções que pode culminar na formação de um tumor sólido clinicamente detectável (Kim et al., 2007; Zhang et al., 2017).

Nesta fase, de escape do tumor, células imunes pró-tumorais, incluindo macrófagos associados a tumores (TAMs), células supressoras de origem mieloide (MDSCs), células T reguladoras (Tregs) e células dendríticas associadas a tumores (TADCs), juntamente com as células tumorais e células-tronco tumorais, induzem a imunossupressão através da secreção de uma variedade de citocinas e moléculas imunossupressoras. Envolvidos em diferentes microambientes, os macrófagos adquirem diferentes fenótipos específicos (Gordon and Taylor, 2005). Os TAMs estão em grandes quantidades nos tecidos tumorais e estão significativamente associados ao progresso e desenvolvimento do tumor. Os TAMs não são considerados um subgrupo clássico de macrófagos com características semelhantes ao fenótipo M2 ou anti-inflamatório (Zhou et al., 2020). Eles promovem o aumento da angiogênese, invasão tumoral e imunossopressão (Di Caro et al., 2016; Salaroglio et al., 2019) e podem produzir citocinas reguladoras. Uma das citocinas anti-inflamatórias produzidas por TAMs é a IL-10. Esta citocina induz a fosforilação de STAT3 em macrófagos e células T. O STAT3 ativado induz o fator nuclear de repressão transcricional regulado pela interleucina 3 (NFIL3), que por sua vez inibe a transcrição da subunidade p40 compartilhada de IL-12 e IL-23, inibindo-as (Kobayashi et al., 2011; Smith et al., 2011). Além disso, a STAT3 ativada também induz o supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3), o qual se liga e inibe a sinalização dos receptores pró-inflamatórios de IL-6 e IL-12/IL-23. Assim, a IL-10 intercepta as respostas inflamatórias de estimulantes de receptores de reconhecimento a padrões em vários níveis (Oft, 2014).

Nos últimos anos, os dados acumulados indicam as MDSCs como um dos tipos celulares importantes no direcionamento de microambiente tumoral imunossupressor (Fleming et al., 2018). Por definição, as MDSCs representam uma população heterogênea de células mieloides imaturas que não se diferenciam terminalmente e exibem uma forte capacidade de suprimir as funções das células T e NK (Gabrilovich, 2017; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Kumar et al., 2016). Sob condições fisiológicas, as células mieloides imaturas se diferenciam em macrófagos, células dendríticas ou granulócitos. Durante uma inflamação aguda, elas possuem a capacidade de se expandir e de se diferenciar, principalmente em monócitos e neutrófilos ativados (Gabrilovich, 2017). Esse processo, conhecido como mielopoiese, é essencial para proteger o hospedeiro frente à uma condição patológica. Diferentemente de uma inflamação aguda, a inflamação crônica e o câncer são caracterizados por uma liberação persistente de sinais de baixa intensidade estimulatória (Meirow et al., 2015; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Ray et al., 2013). Embora esses estímulos ainda atuem a mielopoiese, as células mieloides imaturas falham em se diferenciar completamente em neutrófilos e monócitos ativados. Em vez disso, os sinais inflamatórios de longo prazo criam condições para a expansão e ativação das MDSC (Loftus et al., 2018; Ueha et al., 2011). Seu acúmulo e ativação correlacionaram-se com a progressão do tumor, metástase e recorrência de muitos tipos de tumores. Além disso, a eficácia da imunoterapia foi negativamente correlacionada com o aumento da frequência e atividade do MDSC (Hansen et al., 2015; Limagne et al., 2016).

Os linfócitos Tregs suprimem a resposta imune e exercem essa sua função reguladora através de múltiplos mecanismos. Dentre eles pode-se citar a inibição da função ou maturação de outros linfócitos através da ligação de CTLA-4 presentes em sua superfície celular às moléculas CD80 ou CD86 presentes nas APCs. Essa interação impede a ligação das moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) ao CD28 presente em células T efectoras (Gregori et al., 2012). Além disso, Tregs podem induzir a morte de células T CD4⁺ por apoptose através da privação de triptofano devido a sua alta expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (Cobbold et al., 2009). Outro mecanismo de regulação de Tregs é a desordem no sistema purinérgico de células T efectoras através da conversão de ATP em adenosina via CD39/CD73 (Deaglio et al., 2007). Além disso, as Tregs são fortes produtoras de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 (Marie et al., 2005) e captam IL-2 do microambiente, que é considerada uma citocina importante para induzir proliferação, diferenciação e sobrevivência das células T efectoras (De Serres et al., 2009; Jeffery et al., 2016; Tai et al., 2012).

As células dendríticas (DCs), por sua vez, desempenham um papel fundamental no microambiente do tumor, que é conhecido por afetar a progressão da doença em muitas neoplasias malignas humanas. O infiltrado de DCs maduras e ativas nos tumores confere um aumento na ativação imune e no recrutamento de células efetoras antitumorais. No entanto, as células tumorais desenvolvem formas de supressão da função das DC ou de alteração do microambiente do tumor a fim de se induzir o recrutamento de DCs tolerogênicas (Tran Janco et al., 2015). Os mecanismos de modulação do recrutamento e indução de DCs tolerogênicas no microambiente tumoral ainda não estão elucidados e é objetivo de estudo deste presente trabalho. Portanto, de fato, o microambiente tumoral é heterogêneo e seu perfil fenotípico predominante pode se correlacionar com a resposta clínica e evolução da doença (Fridman et al., 2012).

1.4 Células dendríticas

1.4.1 Definição e fenótipos

As células imunes inatas e adaptativas são importantes componentes do microambiente tumoral que apresentam papéis paradoxais na tumorigênese. De acordo com os dados clínicos e experimentais, o conceito de imunovigilância do câncer foi atualizado a fim de melhor explicar os eventos observados. Portanto, o sistema imune não está apenas envolvido em desenvolver uma resposta imune antitumoral, como também altera e seleciona clones tumorais com características de interesse, através da indução de mutações por pressão seletiva. Esse conceito é descrito na hipótese de imunodeficiência do câncer (Grivennikov et al., 2010; Vesely et al., 2011).

A apresentação de antígenos é um passo fundamental para o desencadeamento de uma resposta imune. Esse processo é realizado através de células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), tais como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B, que expõem em sua membrana peptídeos antigênicos em moléculas de MHC classe I ou II (Mittelbrunn et al., 2011). Moléculas de MHC de classe II, presentes em células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, fagócitos mononucleares, algumas células endoteliais, células epiteliais do timo e células B, estão envolvidas na ativação de células T auxiliares CD4⁺ através da apresentação de peptídeos exógenos, internalizados por endocitose (Roche and Furuta, 2015).

Os peptídeos apresentados por moléculas de MHC classe I, presentes em células nucleadas, são gerados por processamento através do proteassoma, pois, em sua maioria, são endógenos (via clássica). Na via clássica, as proteínas são normalmente sintetizadas de forma

endógena na célula e transformadas pela via da ubiquitina-proteassoma. Portanto, através do monitoramento dos peptídeos gerados e apresentados no MHC-I permitem-se que as células T CD8⁺ monitorem a natureza das proteínas celulares. Em condições fisiológicas normais, todos esses peptídeos apresentados pelo MHC classe I serão de proteínas autólogas e, portanto, esses complexos de peptídeo-MHC de classe I não provocam uma resposta devido ao processo de tolerância imunológica. No entanto, se uma célula está infectada com um vírus ou patógeno intracelular ou expressando genes mutados, os peptídeos antigênicos estranhos serão expostos em moléculas de MHC classe I e células T CD8 efectoras serão ativadas (Cruz et al., 2017).

A via não clássica de apresentação de antígenos via MHC Classe I é denominada de apresentação cruzada e é um processo considerado muito importante para o estabelecimento de uma resposta imune antitumoral (Dustin, 2014). Basicamente, a apresentação cruzada refere-se à apresentação por APCs, em MHC I, de peptídeos exógenos, ou seja, derivados de fonte extracelular, incluindo proteínas internalizadas, micro-organismos ou de fragmentos de células mortas. Durante a apresentação cruzada, proteínas extracelulares são internalizadas por fagocitose ou endocitose e são direcionadas para um compartimento fisicamente distinto no retículo endoplasmático. Posteriormente são processadas e exibidas em moléculas de MHC I-peptídeo na membrana da APC, podendo, portanto, ativar linfócitos T CD8⁺ (Grotzke et al., 2017).

Dentre as células APCs existentes, as descritas no início do século XIX por Paul Langerhans e denominadas de “células dendríticas” em 1973 por Steinman e Cohn, têm sido destacadas como a principal célula envolvida no desencadeamento de uma resposta imune antitumoral (Gardner and Ruffell, 2016; Mellman, 2013). A função da célula dendrítica depende estritamente do seu estado atual de ativação. Sob estado estacionário e dependente de sua localização, as DCs exibem um fenótipo imaturo que se correlaciona com baixa expressão de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86, por exemplo) e propriedades estimulantes de células T fracas (MHC e citocinas pró-inflamatórias) (Banchereau and Steinman, 1998; Harimoto et al., 2013). Durante o processo de maturação de DCs, induzido pelo reconhecimento de moléculas associadas a patógenos ou a dano celular, observa-se uma mudança dramática na sua morfologia e desenvolvimento de extensões celulares que ampliam a superfície celular e melhoraram a interação com as células T. Além desses sinais desencadeados por patógenos ou dano, a inflamação local influencia o processo de diferenciação das DCs. Os principais eventos na maturação das DCs são, provavelmente, a regulação positiva do MHC e moléculas coestimulatórias em sua superfície (Hubo et al., 2013).

Na figura 5 estão descritas algumas moléculas coestimulatórias de DCs, seus ligantes em células T e a resposta imune desencadeada.

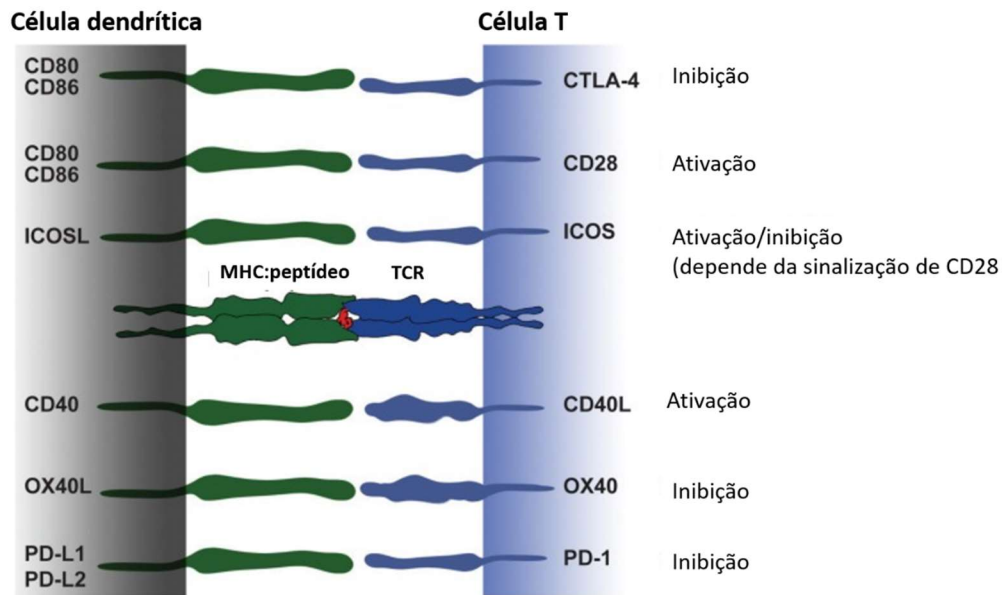


Figura 5 - Moléculas coestimulatórias e seus ligantes - visão geral. A modulação da ativação das células T é mediada por uma interação de diferentes moléculas coestimulatórias expressas nas DCs que têm função imunogênica ou tolerogênica. A imagem mostra uma visão geral dos membros da família de receptores B7 e TNF expressos em DC e seus ligantes em células T. Na última década, novas moléculas coestimulatórias foram identificadas. No entanto, no contexto das CD80 e CD86 derivadas de monócitos constituem membros poderosos da família coestimulatória. Sinais fortes derivados de CD80/CD86 podem superar, por exemplo, sinalização mediada por ICOSL e, assim, transformar um sinal tolerogênico em imunogênico. Fonte: adaptado de Hubo et al. 2013.

A ativação de células T virgens por DCs requer dois sinais, denominados sinal-1 e sinal-2 (Anderson and Siahaan, 2003). O sinal-1 acontece com a ligação do TCR ao complexo peptídeo-MHC (Vesely et al., 2011) e culmina na fosforilação do motivo de ativação baseado em tirosina do imunorreceptor (ITAM) no CD3, que é adjacente ao TCR por Lck quinase (Rossy et al., 2013). A sinalização deve ser sustentada para a ativação eficaz de vias de transdução de sinal que levam à ativação de fatores de transcrição nuclear. O sinal 2 é inicializado pela interação de moléculas coestimulatórias expressas DCs e células T. Sinais positivos (ou de ativação), como CD28/CD80 ou CD86, CD40/CD40L e sinais negativos, como CTLA-4/CD80 ou CD86, PD-L1 ou 2/PD-1 foram identificados (Huang et al., 2012) (Manikwar et al., 2012). O sinal de ativação dessas moléculas coestimulatórias intensifica a resposta do TCR ao antígeno via ativação de domínios citoplasmáticos.

Em contrapartida, sinais de inibição diminuem ou desligam a sinalização induzida após ativação do TCR através de domínios citoplasmáticos ITIM (Acuto et al., 2008). O primeiro exemplo de interação inibitória de células T é a interação entre CTLA-4 (receptor inibitório) e a CD80 e CD86 presentes em DCs (Linsley et al., 1990). Além disso, tem-se interação entre

PD-1 (em células T) e PD-L1 ou PD-L2 presentes em DCs, que desencadeia vias de sinalização imunossupressoras. A ligação entre PD-1 a PD-L1/PD-L2 antagoniza a sinalização positiva do TCR e CD28, regulando a resposta imune adaptativa. Outra característica importante na ativação de células T é o segundo sinal. A ausência do mesmo ou a interação permanente do PD-L1 com PD-1 nos linfócitos leva estas células a um estado de exaustão e inatividade perene (Tai et al., 2018a). Dessa forma, o fenótipo das DCs, bem como o perfil de expressão de seus marcadores e interação com células T no microambiente tumoral, pode influenciar a ativação celular de linfócitos e promover uma resposta antitumoral efetiva ou defeituosa.

O infiltrado de DCs no tumor tem sido associado a um bom ou mau prognóstico em diferentes tipos de tumor, o que não surpreende, devido à complexidade do fenótipo celular, bem como aos métodos de identificação. Por exemplo, pacientes com carcinoma colorretal e um grande número de DCs infiltrantes de tumor exibiram menor sobrevida global quando comparados com indivíduos livres de doença (Jochems and Schlom, 2011). Por outro lado, a presença de DCs infiltrantes de tumor também já foi correlacionada com a regressão do melanoma (Ma et al., 2013). O prognóstico pode estar mais relacionado a uma mudança no fenótipo das DCs infiltrantes de tumor ou às proporções relativas de diferentes subtipos dentro do infiltrado tumoral, do que simplesmente o grau de infiltração das mesmas no tumor (Chang et al., 2014).

As células tumorais e o microambiente tumoral liberam fatores que inibem ou invertem a maturação das DCs e a função normal. Por exemplo, Michielsen e colaboradores mostraram que os meios condicionados obtidos da cultura de explante do tumor colorretal humano eram ricos em VEGF e nas quimiocinas CCL2, CXCL1 e CXCL5. Ao realizar o pré-tratamento de DCs *in vitro* com este meio observou-se a inibição da maturação (Michielsen et al., 2011). O grupo liderado por Krempski descreveu que os tumores paralisam DCs através da indução da expressão de PD-1 (Krempski et al., 2011). Esta constitui importante via imunoreguladora que suprime ou prejudica respostas eficazes de células T, B e mieloides nas fases eliminação tumoral. O bloqueio de PD-1 nas células dendríticas infiltrantes do tumor *in vitro* melhorou a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentou a ativação de NF- κ B nas DCs, aumentou a expressão da moléculas coestimulatórias e melhorou a capacidade dessas DCs de ativar células T (Karyampudi et al., 2014; Krempski et al., 2011). Assim, o fenótipo tolerogênico de DCs infiltrantes do tumor é provavelmente reversível, pelo menos farmacologicamente.

Outro mecanismo pelo qual as DCs são induzidas a um fenótipo imunossupressor ou não imunogênico é através da regulação positiva do domínio da mucina 3 (TIM-3) na superfície celular. O TIM-3 tem sido amplamente estudado como um marcador supressivo de células T

do tipo Th1 e o bloqueio de TIM-3 exacerba doenças auto-imunes mediadas por células T (Anderson, 2012; Han et al., 2013). Chiba e colaboradores descreveram que tumores murinos e humanos induzem a regulação positiva do TIM-3 nas DCs por meio de vários fatores encontrados no microambiente tumoral, como IL-10, TGF- β 1, VEGF-A, IDO e arginase. Além disso, o grupo descreveu a interação entre TIM-3 e HMGB1, impedindo a detecção de sinais de perigo associados a ácidos nucleicos derivado de tumor no microambiente (Chiba et al., 2012).

Além disso, sabe-se que tumores e/ou o microambiente tumoral desempenham um papel na modificação da atividade das DCs, induzindo a regulação positiva de microRNAs nessas células. Min e colaboradores mostraram que vários microRNAs, como miR-16-1, miR-22, miR-155 e miR-503, são aumentados em DCs derivadas da medula óssea por linhas celulares de câncer de ovário, melanoma, colo do útero, pulmão e câncer de mama. Na presença de células tumorais, as DCs sofrem apoptose em taxas mais altas em comparação com as DCs que foram co-cultivadas com fibroblastos normais. Além disso, observou-se que esses microRNAs direcionavam-se especificamente às vias de sinalização PI3K/AKT, MAPK e apoptótica nas DCs (Min et al., 2013).

O ligante para PD-1, PD-L1, é constitutivamente expresso em DCs ativadas e sua expressão é aumentada no microambiente tumoral (Curiel et al., 2003). Os trabalhos realizados por Curiel e Kremski mostraram que o bloqueio de PD-L1, especificamente em células dendríticas infiltrantes no tumor de camundongos, resultou em uma melhor capacidade das DCs em estimular a ativação de células T (Karyampudi et al., 2014; Kremski et al., 2011). Kremski e colaboradores também mostraram que as DCs no tumor coexpressam PD-1 e PD-L1, sugerindo a possibilidade de que a supressão da ativação de células T possa ser mediada por qualquer uma das interações da molécula com PD-L1 ou PD-1 nas células T (Kremski et al., 2011).

As últimas décadas têm sido marcadas pelos sucessivos protocolos de imunoterapia que aumentaram a capacidade endógena de células T exibirem uma resposta imune antitumoral com eficácia terapêutica. Neste contexto, pode-se citar como marco clínico o estudo randomizado que demonstrou que o tratamento de pacientes com melanoma metastático com ipilimumab, um anticorpo que tem como alvo a proteína reguladora de células T CTLA-4, melhorou a sobrevida global dos pacientes (Hodi et al., 2010). Outro exemplo de imunoterapia que se tem obtido bons resultados são os usos de nivolumabe e lambrolizumabe. Trata-se de dois anticorpos direcionados para o receptor PD-1. Como descrito anteriormente, a interação de PD-1 e seus ligantes desempenha uma função natural no organismo a fim de regular a

resposta adaptativa e, inclusive, evitar auto-imunidade. Porém, o tumor pode utilizá-la como mecanismo de evasão tumoral do sistema imune. PD-L1 e PD-L2 estão presentes em APCs, mas também já têm sido descritos em diversos tumores. O bloqueio da interação entre PD-L1 e PD-1 leva a uma otimização da apresentação antigênica e a reversão deste estado de exaustão linfocitária, o que permite a retomada do combate imunológico ao tumor. Tem-se obtido atividade clínica em potencial para diferentes tumores como melanoma, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de estômago, tumor de células renais, câncer de cabeça e pescoço e Linfoma de Hodgkin (Sharma and Allison, 2015). Portanto, a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na ativação celular e seus pontos de reversão pode revelar alvos de intervenção terapêutica a fim de desencadear resposta antitumoral robusta e sustentada.

1.4.2 Papel das células dendríticas no câncer de mama

No microambiente tumoral, células dendríticas infiltrantes já foram descritas em muitos tipos de câncer, como mama, colorretal, pulmão, renal, cabeça e pescoço, bexiga, gástrico e ovário (Karthaus et al., 2012). No câncer de mama, as DC no tumor primário se correlacionaram com pior prognóstico. Quando isolados de biópsias de tumores de mama de pacientes com alto índice mitótico e tumores de mama triplo-negativos (tumores agressivos da mama), as DCs produziram baixas quantidades de IFN- α em comparação com as DCs isoladas do sangue. Essas células também sustentaram a expansão de linfócitos T reguladores (Treg), contribuindo potencialmente para a tolerância imunológica e piorando os resultados clínicos (Sisirak et al., 2012).

Além disso, já foi relatado que os níveis de DCs circulantes em pacientes com câncer de mama estão diminuídos e estas encontram-se ainda funcionalmente comprometidas (Pinzon-Charry et al., 2007) com seu fenótipo tolerogênico e reduzida capacidade de apresentação de antígenos (Gabrilovich, 2004; Harimoto et al., 2013; Karthaus et al., 2012; Krempski et al., 2011). O fenótipo tolerogênico também tem sido identificado em Mo-DCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer (Andoh et al., 2013; Dumitriu et al., 2009; Ramos et al., 2012). Este comprometimento funcional limita a utilização das DCs dos próprios pacientes em tratamentos imunoterápicos sinérgicos que utilizam da capacidade imunoestimuladora de células imunes.

Embora ainda não esteja claro o que induz especificamente essas mudanças fenotípicas das DCs no contexto tumoral, fatores solúveis têm se tornado pontos-chaves de investigação. Portanto, o avanço na compreensão dos mecanismos imunorregulatórios que acontecem no

microambiente tumoral e a nível sistêmico através, por exemplo, de vesículas de comunicação celular é promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antitumorais para reversão do fenótipo imunossupressor das células dendríticas intratumorais.

1.4.3 Sinalização de mTOR na diferenciação e ativação de células dendríticas

1.4.3.1 Visão geral

A ativação das células dendríticas é caracterizada por um aumento no fluxo metabólico da glicose necessário para alimentar as altas taxas anabólicas associadas à ativação das DC. Em contrapartida, a inibição da glicólise atenua significativamente a maioria dos aspectos da função efetiva das DCs, incluindo apresentação antigênica, produção de citocinas inflamatórias e capacidade estimuladora de células T (Snyder and Amiel, 2018).

O alvo de mamíferos da rapamicina, também conhecido como alvo mecanicista da proteína 1 associada à rapamicina e à proteína 1 de ligação à FK506 (FKBP12), é uma quinase que em humanos é codificada pelo gene *MTOR*. O mTOR é um membro da família de proteínas quinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-quinase. É um importante regulador do metabolismo glicolítico e desempenha um papel central na coordenação das alterações metabólicas das DC e nas respostas imunes. A sinalização de mTOR pode ser ativada por uma variedade de estímulos imunológicos, incluindo a sinalização através da família de receptores Toll-like Receptor (TLR) (Snyder and Amiel, 2018). E esta estimulação de TLR das DCs induz um aumento significativo da glicólise aeróbica necessária para a sobrevivência e função imunológica efetiva das DCs (Everts et al., 2014; Krawczyk et al., 2010).

O mTOR é uma serina-treonina-quinase evolutivamente conservada que está presente em, pelo menos, dois complexos proteicos maiores, mTORC1 e mTORC2 (Laplante and Sabatini, 2012). mTORC1 compreende mTOR, proteína reguladora de mTOR (Raptor), substrato AKT1 rico em prolina de 40 kDa (Pras40), mLST8 (também conhecido como GβL) e proteína que interage com mTOR (Deptor) que contém o domínio DEP. mTORC2 compreende mTOR, mLST8 e as proteínas adaptadoras Rictor e proteína 1 de interação com MAP-quinase ativada por estresse (Sin1). O inibidor de mTOR, a rapamicina, inibe a mTORC1 associando-se à FKBP12, que então se liga diretamente à mTORC1 para inibir o posicionamento do substrato na fenda catalítica (Shimobayashi and Hall, 2014). A rapamicina é mais eficaz no bloqueio da fosforilação de S6K1 do que 4E-BP1. Além disso, a rapamicina também pode inibir variavelmente o mTORC2 em concentrações mais altas e em momentos posteriores de maneira específica do tipo de célula. Também existem inibidores catalíticos

competitivos de ATP que bloqueiam a atividade da mTOR quinase, como Torin1, PP242 e AZD8055, que inibem tanto a mTORC1 quanto a mTORC2 (Sukhbaatar et al., 2016).

A inibição da mTOR influencia dramaticamente a maturação da DC (Cheng et al., 2016; Haidinger et al., 2010; Reichardt et al., 2008). DCs tolerogênicas são relatadas como exibindo uma dependência aumentada do metabolismo mitocondrial, em contraste com o fenótipo centrado na glicólise observado para muitos subconjuntos inflamatórios de DC (Malinarich et al., 2015; Sim et al., 2016)

1.4.3.2 Mecanismos moleculares da ativação de mTORC1 e mTORC2

A ativação receptores de reconhecimento padrão, como por exemplo TLRs, ativam moléculas adaptadoras de tirosina-quinase, incluindo a pequena GTPase Rab8a na membrana celular, levando ao recrutamento da família classe I de fosfatidilinositol-3 quinases (PI3K) do complexo receptor (Figura 6) (Chamcheu et al., 2019; Luo et al., 2014; Weichhart et al., 2015). Logo após, o PI3K fosforila o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3) como segundo mensageiro para recrutar e ativar as serina-treonina-quinases Akt1, Akt2 e Akt3 via fosforilação em treonina 308 pela proteína quinase 1 dependente de fosfoinositida (PKD1) (Brazil et al., 2004). A fosfatase supressora de tumor e o homólogo de tensina deletados no cromossomo 10 (PTEN) são fosfatases que desfosforilam o PtdInsP3 para regular negativamente a sinalização de PI3K. O mTORC2 é ativado por PI3K e fosforila Akt na serina 473, o que é importante para a ativação completa e especificidade de substrato de Akt (Shimobayashi and Hall, 2014).

A proteína AKT regula vários processos celulares, como a sobrevivência e a proliferação celular, através de uma variedade de proteínas, como a glicogênio-sintase-quinase 3-beta (GSK-3 β). Dois principais alvos de Akt são a caixa de garfo O1 (FoxO1) (não representado na figura 6) e a esclerose tuberosa 2 (TSC2) (Laplante and Sabatini, 2012). TSC2 forma um complexo heterodimérico com TSC1 e inibe mTORC1. A fosforilação de TSC2 na treonina 1462 (Thr1462) por Akt inibe sua atividade da proteína ativadora de GTPase (GAP) para o pequeno homólogo de GTPase RAS enriquecido no cérebro (Rheb), que, portanto, permanece em um estado ativo ligado a GTP e ativa o mTORC1 (Cornu et al., 2013). Assim, a ativação de PI3K leva à ativação de mTORC1 por meio da inibição de TSC2 (Chamcheu et al., 2019).

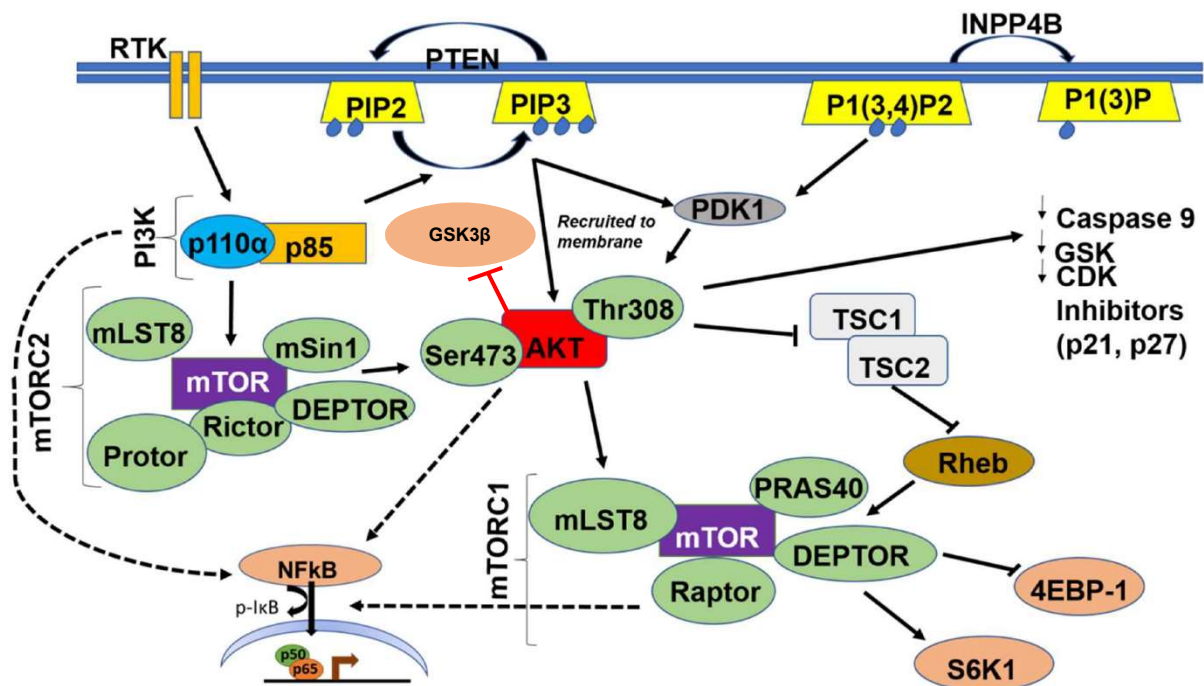


Figura 6 - Ilustração esquemática da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR/NFκB. Setas representam ativação, enquanto barras representam inibição. Após a ativação do receptor, o substrato do receptor de insulina (IRS) ativa o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que, por sua vez, é fosforilado para gerar fosfatidilinositol [3,4,5]-trifosfato (PIP3). A fosfatase e o homólogo da tensina (PTEN) podem desfosforilar o PIP3 para regular a atividade da via. O AKT é ativado e regula vários processos celulares, como a sobrevivência e a proliferação celular, através de uma variedade de proteínas, como a glicogênio-sintase-quinase 3-beta (GSK-3β). O AKT é capaz de fosforilar diretamente e, assim, inativa a proteína rica em prolina de 40 kDa (PRAS40), aliviando a regulação supressora da atividade do mTORC1. Além disso, o AKT pode fosforilar e inativar o complexo proteico supressor de tumor da esclerose tuberosa (TSC) que atua como uma proteína ativadora de GTPase (GAP) para o homólogo de SRA enriquecido no cérebro (Rheb) pequena proteína G para regular sua atividade. A retenção da forma ligada ao Rheb-GTP ativa o mTOR, que é composto por dois complexos principais que estão associados a diversas proteínas, como Raptor, mLST8, PRAS40 e Deptor para o complexo I (mTORC1) e Rictor, mLST8, Deptor, mSin1 e Protor para o complexo II (mTORC2). O mTORC1 fosforila S6K1 (p70S6 quinase 1) e, além de mTORC2 e AKT, também pode modular o fator de transcrição NF-κB. Por outro lado, a regulamentação do mTORC2 ainda está sob investigação, mas sabe-se que é regulada por fatores de crescimento. Fonte: Ghoneum & Said, 2019.

A ativação completa do mTORC1 por fatores de crescimento ou ligantes TLR requer uma suficiência intracelular de nutrientes - aminoácidos, glicose-6-fosfato e ácido fosfatídico do metabólito lipídico, além de oxigênio e energia. O mTORC1 e o mTORC2 são, portanto, ideais para integrar muitos sinais externos e intracelulares e controlar uma ampla variedade de processos celulares básicos, como tradução e síntese de proteínas, transcrição, metabolismo e processos anabólicos que moldam especificamente a resposta imune das DCs (Sukhbaatar et al., 2016).

Como descrito na figura 6, a proteína glicogênio sintase quinase-3β (GSK-3β) é uma das proteínas reguladoras da ativação de mTOR. A GSK-3β é uma serina/treonina quinase

multifuncional encontrada em todos os eucariotos. Foi inicialmente identificada como um regulador chave da síntese de glicogênio dependente de insulina (Doble and Woodgett, 2003). Além disso, sabe-se que a GSK-3 β está envolvida em diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência (Luo, 2009). A GSK-3 é regulada negativamente pela fosforilação de uma serina N-terminal (Ser21 para GSK-3 α e Ser9 para GSK-3 β). De forma geral, a inibição do complexo de mTORC1 por GSK-3 ocorre devido a fosforilação de TSC2, que por sua vez inibe a atividade de Rheb e mTORC1. Além disso, a fosfatase de PTEN está a *upstream* de GSK-3 e regula negativamente a atividade da Akt pela desfosforilação PIP3 que Akt requer para a localização da membrana. Em contraste, a atividade da GSK-3 é facilitada com a fosforilação de tirosinas específicas (Tyr279 em GSK-3 α e Tyr216 em GSK-3 β) (Hughes et al., 1993; Takahashi-Yanaga et al., 2004).

Existem duas formas altamente homólogas de GSK-3 em mamíferos, GSK-3 α e GSK-3 β (Cohen and Frame, 2001). Aproximadamente, 100 proteínas foram relatadas como alvos de fosforilação da GSK-3 β . (Beurel et al., 2015). Historicamente, GSK-3 β tem sido considerado um potencial supressor de tumor devido à sua capacidade de fosforilar e, assim, atingir moléculas pró-oncogênicas, incluindo c-Jun (de Groot et al., 1993), c-Myc (Sears et al., 2000) e β -catenina (Rubinfeld et al., 1996) para degradação proteossômica dependente de ubiquitina. No entanto, relatórios recentes sugeriram que o GSK-3 β é um regulador positivo da proliferação e sobrevivência de células cancerígenas (Kazi et al., 2018; Rubinfeld et al., 1996; Vijay et al., 2019; Zhu et al., 2011), fornecendo suporte adicional ao GSK-3 β como alvo terapêutico no câncer. No carcinoma de mama humano foi demonstrado que a superexpressão de GSK-3 β foi associada a vários indicadores de mau prognóstico, e as pacientes com câncer de mama com expressão de GSK-3 β no quartil mais alto tiveram um aumento de 2,7 e 1,7 vezes risco de recaída após 5 e 10 anos após a ressecção do tumor, respectivamente (Quintayo et al., 2012).

No contexto imune, tem sido relatado o papel da GSK-3 como reguladora das respostas imunes, incluindo a ativação e diferenciação de DCs e endotoxemia (Martin et al., 2005a; Rodionova et al., 2007). Essa regulação ocorre através da quinase JNK (Liu et al., 2004) e NF-AT (Beals et al., 1997). A ativação de JNK e a transcrição induzida por NF-AT controlam o processo de maturação das DC, regulando a expressão de citocinas e moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86) (Nakahara et al., 2004; Preischl et al., 1996). Quando a GSK-3 β é fosforilada na serina 9 (Ser-9) ela se torna inibida e a maturação de Mo-DCs ocorre (Alessandrini et al., 2011). É bem estabelecido que monócitos humanos estimulados *in vitro*

com GM-CSF e IL-4 se diferenciam em células dendríticas, chamadas de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) (Auffray et al., 2009). Mo-DCs, em seu estado imaturo, possuem GSK-3 β constitutivamente ativa, devido à alta fosforilação de Tyr279/216 e baixa fosforilação Ser21/9 de GSK-3 (Rodionova et al., 2007). Coletivamente, essas observações sugerem que a GSK-3 β pode desempenhar um papel crítico na maturação das DCs.

Em relação a linfócitos, a GSK-3 foi relacionada ao aumento da expressão de PD-1 e sua inibição melhorou a resposta das células T. Este efeito foi identificado no trabalho desenvolvido por Zhang e colaboradores descreveram que células T CD8⁺ efetoras são capazes de se desdiferenciar em células-tronco de memória antitumorais, através da inibição da GSK-3 β , via Wnt/ β -catenina, em câncer gástrico. PD-L1 e PD-L2 expressos por tumores se ligam a PD-1 nas células T CD8⁺, levando à evasão do sistema imunológico (Zhang et al., 2018). Taylor e colaboradores identificaram GSK-3 β como uma quinase chave que regula a expressão de PD-1 em células T CD8⁺ e sua inibição bloqueou a expressão de PD-1, resultando em aumento da função de linfócitos citotóxicos (Taylor et al., 2016; Taylor et al., 2018). Na presença de anti-PD-1, SHP-1/2 fosforila o motivo CD28 YMNM que lidera o recrutamento de PI3K. PI3K fosforila e inibe GSK-3 α (Ser21) e GSK-3 β (Ser9) por AKT. Por fim, a inibição da GSK-3 regula positivamente a transcrição do fator de transcrição Tbx21 (Tbet) que inibe a expressão de PD-1 (Taylor et al., 2016; Taylor et al., 2018). Além disso, a reversão da exaustão de células T CD8⁺ através do bloqueio de PD-1 (com uso de anti-PD-1) requer a expressão de CD28 e, através dos estudos realizados por Taylor e colaboradores, foi demonstrado que a inibição da GSK-3 reverteu os efeitos do bloqueio de CD28 com CTLA-4-IgG na resposta citotóxica dos CTLs. Estes resultados sugerem um papel potencial da inibição da GSK-3 como estratégia para ajudar a restaurar as células T CD8⁺ exaustas (Kamphorst et al., 2017; Taylor and Rudd, 2017). Portanto, inibidores da GSK-3 β podem possuir um papel importante na regulação do crescimento de células tumorais bem como a indução de uma resposta imune antitumoral eficiente.

Vários inibidores da GSK-3 β foram desenvolvidos e avançados para ensaios clínicos em estágio inicial, incluindo diferentes tipos e graus de tumores (Palomo and Martinez, 2017). Dentre os inibidores de GSK3 naturais e presente nas células, temos a proteína de interação citoplasmática GSK-3 β (GSKIP). GSKIP faz parte do grupo de proteínas de ancoragem a quinases-A e pode interagir se complexando com PKA e GSK-3 β . É conhecida por agir em sinergia com a sinalização de cAMP/PKA para inibir a atividade de GSK-3 β (Hundsrucker et al., 2010a). O GSKIP também interage diretamente com o GSK-3 β , regulando negativamente

a sinalização do GSK3 β (Chou et al., 2006) Por sua vez, GSK-3 β pode ser fosforilada e inativada pela fosforilação de Ser-9 por várias quinases, incluindo a proteína PKA (Fang et al., 2000), PKB (Haq et al., 2003) e p38 MAPK (Thornton et al., 2008). Hundsrucker e colaboradores em seu estudo pioneiro observou que GSKIP facilita a fosforilação da GSK3- β pela PKA no Ser-9 e, portanto, sua inibição (Hundsrucker et al., 2010b). Porém, existem poucos estudos que avaliam a função de GSKIP em diferentes contextos e patologias. No contexto tumoral, ainda não existem trabalhos que avaliam sua modulação, bem como sua regulação em células imunes. Neste sentido, nos últimos 10 anos, a comunicação celular através de vesículas extracelulares (EV) têm sido apontada como veículo relevante para investigação (Xu et al., 2016).

1.6 Comunicação intercelular através de vesículas extracelulares

1.6.1 Tipos de vesículas extracelulares

A comunicação bidirecional entre as células e seu microambiente é crucial para a fisiologia normal dos tecidos e para a organização de processos fisiopatológicos. Sabe-se, tradicionalmente, que essa comunicação ocorre através do contato direto célula-célula ou secreção de fatores solúveis (por exemplo, hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) (Ahmed and Xiang, 2011; Peinado et al., 2011). No entanto, nos últimos 10 anos, um novo paradigma envolvendo o tráfego de vesículas extracelulares (EV) emergiu como um mecanismo de comunicação célula a célula (Xu et al., 2016). Por classificação, EVs são pequenas vesículas de membrana de tamanho heterogêneo, entre 20 nm a 2 μ m, delimitadas por uma bicamada fosfolipídica e liberadas por todos os tipos de células em vários fluidos biológicos e no espaço extracelular (Yin et al., 2015).

Devido ao grande impacto de descrição de EVs que possuem grande importância em processos fisiológicos e patológicos, em 2013, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido a três cientistas “por suas descobertas de máquinas que regulam o tráfego de vesículas, um importante sistema de transporte em nossas células” (Pfeffer, 2013). Randy Schekman descobriu um conjunto de genes necessários para o tráfego de vesículas (Kaiser and Schekman, 1990). James Rothman identificou a maquinaria proteica que permitem que as vesículas se fundam com seus alvos para permitir a transferência de vesículas (Balch et al., 1984). Por fim, Thomas Sudhof revelou como os sinais instruem a célula a organizar exossomos de microvesículas e entregá-los no lugar certo, na hora certa (Hata et al., 1993).

As EVs podem agir no espaço intersticial e a longas distâncias sendo liberadas em fluidos corporais até serem capturadas por células receptoras. As EVs foram associadas a vários

processos fisiológicos e patológicos, tais como inflamação, distúrbios imunológicos, doenças neurológicas e o câncer (Cossetti et al., 2014; Hazan-Halevy et al., 2015; Zomer et al., 2015). De forma geral, as vesículas extracelulares podem ser divididas em microvesículas/ectossomos, exossomos e corpos apoptóticos (Sato-Kuwabara et al., 2015a), cada um com características específicas, incluindo sua biogênese, tamanho, origem celular, composição proteica, conteúdo de mRNA e miRNA e/ou função biológica (Revenfeld et al., 2014).

Os exossomos foram primeiramente descritos por Pan e Johnstone em 1983 em seus estudos de maturação de reticulócitos ovinos. Nestes estudos, foi observada a liberação de receptores de transferrina associados a uma pequena vesícula de aproximadamente 50 nm, no espaço extracelular (Johnstone et al., 1987). Nos últimos 30 anos, houve um grande crescimento na pesquisa envolvendo exossomos, o que culminou na formação de sociedades como a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares e a Sociedade Americana de Exossomos e Microvesículas, além da criação de uma revista específica “Journal of Extracellular Vesicles” (Harding et al., 2013).

A definição precisa e distinção de exossomos de outras microvesículas é ainda polêmico na literatura. O seu significado mudou ao longo do tempo no esforço de compreender sua origem endocítica e distinção, ainda mais que há uma sobreposição de tamanho que caracteriza exossomos e microvesículas. Atualmente, os exossomos são definidos como moléculas heterogêneas com um diâmetro cerca de 100 a 150 nm e uma densidade específica de 1,10-1,18 g/mL. Eles também refletem o estado fenotípico das células progenitoras a partir das quais são geradas (Kowal et al., 2016).

Para a formação de exossomos, primeiramente ocorre o amadurecimento de endossomos iniciais até a formação de endossomos tardios ou corpos multivesiculares (MVBs), que são caracterizados pela presença de múltiplas pequenas vesículas interluminais (ILVs). As ILVs se formam através da incorporação, de forma seletiva, de diferentes moléculas provenientes da células (Akers et al., 2013; Kalluri, 2016). Quando MVBs maturam seu conteúdo pode ser direcionado à fusão com lisossomos para degradação ou fusão com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo de ILVs que, no espaço extracelular, são chamados de exossomos (Samanta et al., 2018).

Sabe-se que os quatro complexos de classificação endossômica necessários para o transporte (ESCRT-0 – III) são os principais impulsionadores da formação de exossomos baseados em MVB – ILV (Colombo et al., 2013; Hurley, 2015). Este processo envolve a ubiquitinação reversível de proteínas na seleção de proteínas direcionadas às ILVs (Buschow et al., 2005). Além da formação de MVBs e exossomos dependentes de ESCRT, existem caminhos

independentes de ESCRT que envolvem formação de ceramida dependente de esfingomielinase neutra (N-SMase) (Trajkovic et al., 2008), bem como o fator de ribosilação ADP 6 (ARF6) e fosfolipase D2 (PLD2) (Ghossoub et al., 2014). A proteína sintenina 1 (SDCBP) é descrita como potencial reguladora do direcionamento da carga a ser incorporada para membranas endossômicas e MVBs (Baietti et al., 2012). A maquinaria biogênica dependente de ESCRT e independente de ESCRT para biogênese de MVB e exossomo pode variar entre tecidos (ou mesmo entre tipos de células), dependendo de sua composição lipídica específica, mas não é claro se os dois mecanismos alternativos da biogênese do exossomo podem ocorrer em um único MVB ou se diferentes populações de MVBs que refletem os dois mecanismos de biogênese do exossomo podem coexistir dentro da célula (Budnik et al., 2016).

A composição proteica dos exossomos ainda é majoritariamente desconhecida. Devido à particularidade de sua origem endossômica, todos os exossomos contêm moléculas de transporte de membrana e proteínas de fusão (GTPases, Anexinas, e flotilina), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 e CD82), proteínas de choque térmico (Hsc70, Hsp 90, Hsp60 e Hsp20), proteínas envolvidas na biogênese do corpo multivesicular (Alix, TSG101), proteínas e fosfolipases relacionadas a lipídios (Samanta et al., 2018). Proteínas adicionais associadas especificamente a exossomos, muitas vezes ausentes em outros EVs são Tsg101 e proteína de interação de morte celular programada-6 (PDCD6IP), mais comumente conhecida como ALIX. Essas proteínas fazem parte do complexo ESCRT (ESCRT I e III, respectivamente) e desempenham um papel direto na biogênese dos exossomos, com componentes específicos que afetam, de forma diferente, a liberação vesicular (Colombo et al., 2013). Os exossomos podem carrear diferentes tipos de ácidos nucléicos, incluindo DNA em alguns casos, mas principalmente pequenos RNAs, como RNA ribossômico, RNA transportador, miRNAs e RNA mensageiro, que são incorporados de forma seletiva nas vesículas. Os mecanismos pelos quais promovem e controlam o enriquecimento de seu conteúdo ainda não são compreendidos, mas a presença de motivos de sequência “*zipcode*” e mudanças pós-transcricionais são algumas das maneiras pelas quais mRNAs e miRNAs específicos são incorporados em exossomos (Abels and Breakefield, 2016). Após liberação no espaço extracelular, os exossomos são captados por células receptoras e podem modular e desencadear diferentes processos regulatórios no organismo, em condições fisiológicas e patológicas.

Comparada aos exossomos, a biogênese das microvesículas (ectossomos, micropartículas) é relativamente simples. Essas vesículas são formadas diretamente a partir da brotação ou desprendimento da membrana plasmática e têm diâmetros de partículas que variam de 50 nm a 10 μ m (Gould and Raposo, 2013). A biogênese das vesículas derivadas de

membrana plasmática é diversa e homóloga aos exossomos. A reticulação dos receptores da superfície da membrana induz a retração da membrana através da via ESCRT para formar endossomos iniciais que se diferenciam em exossomos ou brotam para formar vesículas derivadas da membrana plasmática (Colombo et al., 2014). Além disso, estresse externo (dano ao DNA e irradiação), alterações nos níveis intracelulares de cálcio (Hugel et al., 2005), e a superexpressão da GTPase ARF6 também podem desencadear a liberação de EVs derivados de membrana plasmática ao remodelar o citoesqueleto (Muralidharan-Chari et al., 2009).

Por último, os corpos apoptóticos advêm da fragmentação de célula apoptótica categorizada em três etapas distintas morfológicas: formação de bolhas de membrana apoptótica, formação de fina saliência membrana e geração de corpos apoptóticos que são geralmente definidos como 1-5 µm de diâmetro (Kerr et al., 1972).

1.6.2 Vesículas extracelulares no contexto tumoral

Além de sua função na fisiologia normal, as EVs também participam de processos patológicos, como a progressão de doenças neurodegenerativas (Budnik et al., 2016) e o câncer (Amit et al., 2020; Peinado et al., 2017; Rodrigues et al., 2019). No contexto do câncer, as EVs estão envolvidas em uma ampla gama de processos subjacentes à progressão do câncer - as chamadas 'características do câncer' (Hanahan and Weinberg, 2011) - incluindo respostas inflamatórias, angiogênese, linfogênese, migração celular, proliferação celular, imunossupressão, invasão, transição epitelial para mesenquimal e metástase. As EVs têm sido implicadas em muitas facetas do desenvolvimento e progressão do câncer e são, portanto, candidatas ideais como biomarcadores e/ou ferramentas terapêuticas para o tratamento antineoplásico (Xu et al., 2018).

As primeiras evidências de que células tumorais liberam vesículas extracelulares surgiram em 1978, a partir de estudos de pacientes com Linfoma de Hodgkin, em que Friend e colaboradores descreveram-nas como "partículas raras, pleomórficas, alinhadas à membrana, com tamanho variando entre 400 e 1200 Å" (Friend et al., 1978). Posteriormente, outro estudo independente identificou a presença de vesículas enriquecidas com antígenos associados a tumor em líquido ascítico de camundongos com leucemia induzida (van Blitterswijk et al., 1979). Desde então, a liberação de exossomos tem sido descrita em diferentes tipos celulares, incluindo DCs e diferentes células tumorais, bem como sua presença em fluidos corporais de pacientes com câncer (Czernek et al., 2015; Haderk et al., 2017; Hornick et al., 2016; Romagnoli et al., 2015; Xiong et al., 2017), indicando sua importância *in vivo*.

1.6.2.1 EVs como medida de ataque ao sistema imune

Na fisiologia celular normal, as EVs são atualmente apreciadas como mensageiros importantes na organização das respostas imunes durante processos, como reparo de feridas e infecção por antígenos (Laberge et al., 2018; Robbins and Morelli, 2014). Os primeiros trabalhos na área revelaram que as células imunes utilizam das EVs, particularmente dos exossomos, para mediar a apresentação de antígenos com outras células em nível sistêmico (Raposo et al., 1996; Wolfers et al., 2001; Zitvogel et al., 1998). Este fenômeno ocorre devido a possibilidade de, ao final do processamento de antígenos em compartimentos endossômicos, os complexos de peptídeos em moléculas de MHC classe I e II poderem ser exibidos na superfície das vesículas intraluminais (Roche and Furuta, 2015). No câncer, por exemplo, as respostas imunes antitumorais podem ser estimuladas pela detecção de peptídeos únicos expressos pelas células tumorais em consequência de alterações genômicas, denominados como "neoantígenos", que podem ser apresentados em moléculas de MHC (Schumacher and Schreiber, 2015).

Em 1998, Zitvogel e colaboradores relataram que DCs secretam exossomos contendo MHC classe I e II e moléculas coestimulatórias de células T (Zitvogel et al., 1998). Em um estudo subsequente, eles mostraram que células tumorais liberam EVs que atuam como fonte antigênica para promover a ativação de células T citotóxicas (Wolfers et al., 2001). Outros trabalhos têm sugerido que as EVs podem atuar na apresentação antigênica de células dendríticas (Battisti et al., 2017). Porém, imunoterapias baseadas em células dendríticas, carreando antígenos solúveis ou lizados tumorais, tiveram um sucesso muito limitado em provocar respostas antitumorais em ensaios clínicos, sejam elas alogênicas ou autólogas (Bu et al., 2011; Dionisi et al., 2018; Florcken et al., 2013; Gu et al., 2015; Liu et al., 2018; Palucka et al., 2006; Sabado et al., 2017).

Estudos iniciais, realizados por Andreola e colaboradores (2002), investigaram as interações das EVs derivadas de células de melanoma humano com linfócitos. Neste trabalho, os autores identificaram que as EVs liberadas pelas células tumorais contém o ligante Fas e podem estimular a apoptose das células T (Andreola et al., 2002). Estes achados são apoiados por trabalhos que também elucidaram que EVs derivados de um conjunto diversificado de tipos de células tumorais estimulam a apoptose nas células T CD8⁺, em um processo dependente do ligante Fas ou TRAIL, também conhecido como TNFSF10 (Bergmann et al., 2009; Huber et al., 2005; Wieckowski et al., 2009). Tumores que mostram uma alta densidade de células T

CD8⁺ infiltrantes geralmente se apresentam um melhor prognóstico e respostas terapêuticas em vários tipos de câncer (Gibney et al., 2016; Katsuya et al., 2016; Sato et al., 2005; Xu et al., 2019). Contudo, existem muitos tumores que carecem de infiltrado de células T, geralmente chamados de 'tumores frios' ou “não inflamados”, e isso representa uma grande barreira para uso de imunoterapia (Bonaventura et al., 2019). Dentre as possíveis explicações da resposta imune deficiente em tumores frios, temos o recrutamento defeituoso de células dendríticas.

A segunda etapa da resposta imune antitumoral consiste na apresentação de antígenos tumorais por DCs (Merad et al., 2013). Em particular, existem algumas evidências mostrando que que humanos, uma proporção mais alta de células dendríticas do tipo cDC1s (inflamatórias) sobre monócitos/macrófagos no microambiente tumoral favorece respostas imunes adaptativas antitumorais eficazes (Guilliams et al., 2014). Spranger e colaboradores (2016) mostraram no melanoma que a expressão do MHC e o infiltrado de DC estão associadas ao infiltrado de células T, sendo que as DCs com perfil inflatório se mostraram eficientes na indução de células T CD8 antitumorais através da apresentação cruzada de antígenos exógenos no MHC-I (Spranger et al., 2016). Além disso, já tem sido demonstrado uma forte correlação entre o transcrito do gene CD8 e os marcadores de DCs inflamatórias, sugerindo que a falta de ativação e infiltração de células T no microambiente de tumores frios está principalmente associada a um recrutamento e ativação defeituosos de cDC1 (Broz et al., 2014; Spranger et al., 2017). Assim, a elucidação de mecanismos de recrutamento e regulação de fenótipo de DCs no microambiente tumoral pode contribuir para identificação de pontos de intervenção terapêutica.

1.6.2.2 EVs como mecanismo de escape tumoral

A capacidade invasiva do tumor progride gradualmente durante a patogênese e o desenvolvimento da maioria das células tumorais. Durante esse processo, as alterações biológicas e genéticas das células filhas tumorais podem ser transferidas através de vesículas extracelulares, que resultam no compartilhamento de características biológicas entre as células tumorais. Portanto, as vesículas extracelulares são importantes mediadores para a modulação do microambiente tumoral, podendo orquestrar eventos críticos para o crescimento tumoral, como a indução de metástase e mecanismos de escape tumoral do sistema imunológico (Sheehan and D'Souza-Schorey, 2019; Sun et al., 2018).

No trabalho desenvolvido por Bobrie e colaboradores (2012), observou-se que exossomos derivados de adenocarcinomas ductais pancreáticos (PDACs) induzem o

estabelecimento de nicho pré-metastático no fígado em camundongos, resultando em aumento da carga metastática hepática. De forma resumida, a captação de exossomos positivos para o fator inibidor da migração macrofágico (MIF) derivados de PDAC e direcionados às células de Kupffer aumentou a secreção do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e regulou positivamente a produção de fibronectina pelas células hepáticas estreladas. Durante esse remodelamento do microambiente, observou-se influxo de macrófagos derivados da medula óssea e fornecimento de um nicho favorável para metástases pancreáticas no fígado (Bobrie et al., 2012).

Pontos de verificação imunes, como PD-L1 (também conhecido como CD274) e CTLA-4 também são frequentemente expressas por células tumorais e atuam como poderosos indutores de tolerância imunológica. Estratégias terapêuticas de utilização de anticorpos monoclonais direcionados a essas moléculas foram desenvolvidas como um método de impedir a sinalização inibitória nas células T CD8⁺ e, assim, habilitar a atividade citotóxica a tumores (Fritz and Lenardo, 2019; Pardoll, 2012). Porém, embora PD-L1 e CTLA-4 tenham demonstrado sucesso em melhorar a imunidade antitumoral para vários tipos diferentes câncer, apenas uma minoria dos pacientes apresenta respostas que resultam em sobrevida a longo prazo (Fares et al., 2019; Schadendorf et al., 2015; Sharma et al., 2017). Neste sentido, uma série de estudos recentes demonstraram conclusivamente que EVs derivadas de tumores contribuem substancialmente para fenótipos imunossupressores por carregarem o PD-L1 (Chen et al., 2018; Theodoraki et al., 2018).

Ricklefs et al. (2018) demonstraram *in vitro* que a co-incubação de EVs (que carregam moléculas de MHC-Ag) derivados de células células-tronco de glioblastoma inibem a ativação de células T CD8⁺. Esta inibição da ativação da célula T por EVs poderia ser revertida com anticorpo de bloqueio de PD-L1 (Ricklefs et al., 2018). Para avaliar a importância do PD-L1 exossômico na progressão do câncer de próstata murino *in vivo*, Poggio e colaboradores em 2019, utilizando camundongos geneticamente deficientes para *Rab27a* e *nSMase2*, que são deficientes para a produção de exossomos, e exossomos introduzidos de forma exógena, mostraram que PD-L1 exossômico de células tumorais promove o crescimento tumoral. A remoção do PD-L1 exossômico inibe o crescimento do tumor, mesmo em modelos resistentes a anticorpos anti-PD-L1. Além disso, o PD-L1 exossômico introduzido sistemicamente reverte o crescimento de tumores incapazes de dividir. A exposição a células tumorais deficientes em PD-L1 exossômicas suprime o crescimento de células tumorais do tipo selvagem injetadas em um local distante, simultaneamente ou meses depois. Os anticorpos anti-PD-L1 funcionam de

maneira aditiva, não redundante, com bloqueio exossômico de PD-L1 para suprimir o crescimento do tumor. Juntos, esses resultados mostraram que o PD-L1 exossômico representa um alvo terapêutico inexplorado, que pode superar a resistência às abordagens atuais de anticorpos (Poggio et al., 2019). Juntos, esses estudos estabelecem um papel para as EVs derivadas de tumores na indução de imunossupressão sistêmica ao transmitir sinais utilizando pontos de verificação imunológica de forma sistêmica. Em termos de aplicações clínicas, PD-L1 exossômico também poderia ser potencialmente utilizado no futuro como um marcador diagnóstico para prever respostas tumorais (Chen et al., 2018; Poggio et al., 2019; Ricklefs et al., 2018; Theodoraki et al., 2018).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) são frequentemente encontrados de forma abundante no microambiente tumoral. Os macrófagos maduros foram convencionalmente classificados como sendo um fenótipo 'classicamente ativado' (M1) (geralmente considerados pró-inflamatórios e citotóxicos) ou um fenótipo alternativamente ativado (M2) (considerado anti-inflamatório e imunossupressor) (Ostuni et al., 2015). Trabalhos têm demonstrado que EVs derivadas de tumores influenciam na polarização de monócitos em direção a um fenótipo imunossupressor de TAM (Ham et al., 2018; Hsu et al., 2018; Wang et al., 2018; Ying et al., 2016). Por exemplo, observou-se que os monócitos tratados com EV de células tronco de glioblastoma exibem marcadores aumentados associados com macrófagos M2, como CD163 e CD206, e aumento da expressão de moléculas imunossupressoras, como secreção de IL-10 e produção de PD-L1 (Gabrusiewicz et al., 2018). Em relação aos mecanismos moleculares, estudos publicados conferem o efeito de reprogramação de macrófagos através de miRNA específicos em EVs na reprogramação de macrófagos (Cooks et al., 2018; Hsu et al., 2018).

EVs tumorais podem inibir a proliferação e induzir apoptose de células T CD8⁺ (Bergmann *et al.*, 2009). Porém, efeitos opostos também já foram observados quando as células T CD4⁺ foram testadas com EVs tumorais (Wieckowski et al., 2009). Foi observado, por exemplo, que células T CD4⁺ tratadas com EV (que carregam MHC) diferenciavam-se em células T reguladoras CD25^{high}/FOXP3⁺ (Tregs), que são conhecidas por manter a auto-tolerância e suprimir respostas imunes (Szajnik et al., 2010; Wieckowski et al., 2009). Além disso, as EVs tumorais parecem até promover a proliferação de células Treg e aumentar sua atividade imunossupressora (Szajnik et al., 2010). No trabalho realizado por Tung e colaboradores (2018), foi verificado que as próprias Tregs liberam EVs que também modificam o comportamento do células imunes receptoras, como a promoção de tolerância imune em células dendríticas (Tung et al., 2018).

Porém, além de todos esses achados, foi relatado que as células T em grande parte, não captam preferencialmente exossomos derivados de tumores quando comparados a outros tipos de células imunes testadas, indicando que os efeitos mediados por EVs derivadas de tumores são restritos a interações de superfície (Muller et al., 2016; Muller et al., 2017). Portanto, o mecanismo de interações de como EVs tumorais medeiam a atividade de Treg não ainda foi elucidado.

1.6.3 miRNAs como moléculas de comunicação celular carregados por vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares, principalmente os exossomos, transportam diferentes macromoléculas, dentre elas RNAs mensageiros e todos os tipos de RNAs não codificantes, como RNA longo não codificante, RNA pseudogênico, siRNA (RNA interferente pequeno), piRNA (RNA interativo Piwi), RNA viral, RNA circular, e miRNA (Huang et al., 2013; Kogure et al., 2013; Sato-Kuwabara et al., 2015b).

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificantes, geralmente com 19 a 24 nucleotídeos de comprimento e reguladores sofisticados de RNAs codificantes. Eles regulam negativamente os mRNAs no nível pós-transcricional, ligando os alvos candidatos em regiões específicas, “locais de ligação”, causando inibição da tradução de proteínas. Cada miRNA atua em vários alvos de mRNA, enquanto qualquer mRNA pode ser bloqueado por diferentes miRNAs. Essa intrincada rede é dedicada a manter um ajuste fino de várias funções biológicas (Alfonsi et al., 2018). Como os cânceres mostraram expressão aberrante do perfil do miRNA, sua alteração assume uma função fundamental na progressão do tumor. Estudos recentes têm implicado a carga de miRNA exossômico do tumor na comunicação intercelular e no fortalecimento da agressividade neoplásica (Amit et al., 2020; Sueta et al., 2017).

Embora a carga exossômica de miRNA seja proveniente das células parentais, diversas linhas de evidência relataram que o miRNA é incorporado de maneira seletiva nos exossomos. A captura de miRNAs nos exossomos parece ser um processo não aleatório e é ditada por mecanismos específicos. De fato, foram relatadas sequências específicas de miRNA para facilitar o seu upload para exossomos através de complexos proteicos específicos (Nolte-t Hoen et al., 2012; Srivastava et al., 2015; Villarroya-Beltri et al., 2013).

Sabe-se que quando captados pelas “células alvo”, os miRNAs exossômicos exercem sua função biológica (Zhou et al., 2014) e, em particular, podem reprogramar a imunidade para promover o câncer (Eichmuller et al., 2017). No trabalho desenvolvido por Fabbri e

colaboradores (2012), identificou-se a interferência mediada por miRNA exossômico entre TAMs e pulmão. Em particular, os autores demonstraram que no câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) ocorre a liberação de exossomos contendo miR-21 e miR-29a. Ao serem interceptados por TAMs, esses miRNAs se ligam a receptores de reconhecimento padrão como TLR8 (receptor tipo Toll 8), ativando uma sinalização celular que culmina na ativação do fator nuclear kappa cadeia leve das células B ativadas (NF- κ B). Finalmente, esta ativação leva a um aumento da secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que possuem efeito pró-metastático (Fabbri et al., 2012). De maneira semelhante, outro grupo demonstrou que os exossomos produzidos pelo câncer epitelial de ovário contêm miR-222-3p que, ao ser captado por macrófagos (i) suprimiu a expressão de SOCS3; (ii) consequente fosforilação de STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição); e (iii) causou polarização de macrófagos em direção a um fenótipo M2. Como resultado, houve a promoção da progressão do câncer epitelial de ovário (Ying et al., 2016).

Bell e Taylor relataram que proteínas, assim como miRNAs específicos (miR-24-3p, miR-891a, miR-106a-5p, miR-20a-5p e miR-1908), transportados por exossomos, poderiam modular a função das células T no carcinoma nasofaríngeo (NPC) (Ye et al., 2014). Em outro estudo, o miR-214 derivado de exossomo tumoral regulou negativamente os níveis de PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) e promoveu a expansão da população de Tregs em camundongos. Nesse cenário, as células Tregs ativadas pelo miR-214 produziram altos níveis de IL-10, promovendo imunossupressão e facilitando o enxerto de tumor em camundongos (Yin et al., 2014). De maneira semelhante, Okoye e colegas mostraram que os exossomos derivados de células Treg modulam a atividade de PTGS2 (prostaglandina-endoperoxidase sintase 2), transferindo miRNAs específicos de PTGS2. O silenciamento de PTGS2 resulta na inibição das respostas efetoras de Th1 (Okoye et al., 2014).

Além disso, um grupo de miRNAs exossômicos secretados por células cancerígenas pancreáticas pode mediar a imunomodulação em células dendríticas. Em particular, o miR-212-3p exossômico inibe a expressão de RFXAP (proteína associada ao fator regulador X), um fator-chave de transcrição para o gene MHC-II, com consequente diminuição na expressão de MHC classe II e indução de tolerância imunológica nas DCs (Ding et al., 2015). Em um modelo de adenocarcinoma pancreático, foi demonstrado que o miR-203 derivado de exossomo do tumor regula a expressão de TLR4 de maneira negativa, afetando a produção de TNF- α e IL-12 e prejudicando a maturação de DC e a diferenciação de Th1 (Zhou et al., 2014). Por fim, experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que dois miRNAs diferentes, miR-146a e miR-155, liberados a partir de exossomos liberados por DC, estão envolvidos no processo de

inflamação e regulam as respostas celulares à endotoxina (Alexander et al., 2015; Czernek and Duchler, 2017).

Portanto, pode-se observar que os exossomos e sua carga de miRNA possuem papel crucial nos processos de imunomodulação de tumores. Ainda não se sabe os efeitos de vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama em células dendríticas, células centrais do sistema imune que medeiam uma resposta imune antitumoral. Portanto, a compreensão dos efeitos, mecanismos reguladores, bem como o conteúdo de miRNAs presentes nas EVs de pacientes com câncer de mama oferece boas perspectivas de identificação de biomarcadores, diagnóstico e pontos de intervenção da oncologia moderna.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunorregulação a nível molecular e funcional de vesículas extracelulares derivadas de pacientes com carcinoma de mama ductal invasivo em células dendríticas diferenciadas *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar vesículas extracelulares isoladas do plasma de pacientes e doadores saudáveis, bem como obtidos de sobrenadante de cultura de linhagens tumorais através de western blot, analisador de nanopartículas e microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar o fenótipo de células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos saudáveis (Mo-DCs) na presença de vesículas extracelulares de doadores saudáveis, pacientes com carcinoma ductal invasivo ou sobrenadante de cultura celular tumoral, separadamente;
- Avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos T alogênicos estimulados por Mo-DCs diferenciados na presença de vesículas extracelulares de doadores saudáveis, pacientes com carcinoma ductal invasivo ou de sobrenadante de cultura celular tumoral, separadamente;
- Caracterizar o ensaio de funcional de proliferação de linfócitos alogênicos a fim de determinar o fenótipo celular e produção de citocinas pelas células T;
- Avaliar o perfil de citocinas secretadas em co-cultura com Mo-DCs diferenciadas na presença de vesículas extracelulares de doadores saudáveis, pacientes com carcinoma

ductal invasivo, separadamente;

- Avaliar as vias de sinalização celular alteradas após a ativação de Mo-DCs diferenciadas na presença de vesículas extracelulares de pacientes com carcinoma ductal invasivo;
- Avaliar o conteúdo de miRNAs presentes em vesículas extracelulares para possível intervenção farmacológica;
- Avaliação da modulação de vesículas extracelulares isoladas de células tumorais *in vivo*;
- Avaliar o efeito imunomodulador de vesículas extracelulares *in vivo*.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostras biológicas

3.1.1 Doadores saudáveis

Amostras de sangue total periférico de 30 (trinta) doadoras saudáveis, com idade média similar ao grupo de pacientes com câncer de mama, foram coletadas com o anticoagulante heparina (BD Vacutaine). Os critérios de inclusão nesse grupo foram: ser mulher saudável sem histórico de câncer ou qualquer outra doença crônica, que não estava fazendo uso de medicamentos como antibióticos, analgésicos, antiinflamatórios e/ou antigripais. Todas as doadoras foram devidamente esclarecidas sobre o objetivo do trabalho e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São João del Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu (CEPES CCO) sob o parecer 538.451 (ANEXO 1).

3.1.2 Pacientes com carcinoma ductal invasivo

Amostras de sangue total periférico de 30 (trinta) pacientes recém diagnosticadas com carcinoma de mama ductal invasivo foram obtidas no Hospital do Câncer de Divinópolis-MG para isolamento de vesículas extracelulares. Após explanação dos objetivos do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as pacientes virgens de tratamento, seja este cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou hormonal, foram submetidos à coleta de 20 mL de sangue periférico com o anticoagulante heparina (BD Vacutaine). Pacientes que já se encontravam em tratamento, com recidiva ou câncer metastático foram excluídas da pesquisa. A coleta das amostras foi realizada nos consultórios médicos localizados no terceiro andar do Hospital do Câncer de Divinópolis. O projeto foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de

São João del Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu (CEPES CCO) sob o parecer 538.451 (ANEXO 1). Amostras de plasma de pacientes com câncer de mama que se obedeciam aos critérios de inclusão e exclusão do estudo também foram obtidas do Hospital Alberto Cavalcanti da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo-Horizonte. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob número 38538714.20000.5149.

3.3 Obtenção e quantificação dos exossomos

3.3.1 Isolamento a partir do plasma

As VEs foram isoladas a partir de sangue periférico de doadores saudáveis e de pacientes do grupo de câncer de mama. Para obtenção de VEs a partir de sangue periférico, com o enriquecimento de pequenas vesículas, foram utilizadas diferentes etapas de centrifugação de acordo com Théry *et al.*, 2006 (Thery et al., 2006). Resumidamente, o sangue periférico coletado foi submetido a uma primeira centrifugação de 1200g para obtenção do plasma por 10 minutos, 4°C e, posteriormente, a 17.000g por 45 minutos, 4°C (Termo Scientific) para sedimentação e eliminação de complexos proteicos e microvesículas/ectovesículas. Em seguida, o sobrenadante da etapa anterior foi submetido a ultracentrifugação a 100.000g por 70 minutos, 4°C, em rotor de ângulo fixo (Beckman Coulter). O *pellet* obtido dessa primeira ultracentrifugação foi ressuspensionado em PBS e novamente ultracentrifugado a 100.000g por 70 minutos, 4°C, para obtenção do *pellet* contendo VEs de pequeno tamanho.

Ao final da ultracentrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado em 200µL de PBS, filtrados utilizando membrana de 0,22µm (COSTAR® SPIN-X, Sigma), a 8000g por 5 minutos, para retenção de possíveis microvesículas com tamanho superior a 220nm, indesejadas, e esterilização do material a ser utilizado nos ensaios biológicos. Uma alíquota do material foi utilizada para quantificação de proteína pelo BCA™ Protein Assay Kit (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, e o restante alíquotado e estocado à -80°C para posterior uso nos ensaios biológicos.

3.3.2 Isolamento a partir do sobrenadante de cultura celular

As VEs dos sobrenadantes de cultura celular foram obtidas utilizando a solução de precipitação de exossomos Exoquick-TC (Systems Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 5 mL de sobrenadante, após sedimentação de células a 300g, 10 minutos, foram misturados com 1mL da solução de precipitação de exossomos e incubados na geladeira *over-night*. Decorrido o tempo, a mistura foi centrifugada a 1500g por 30 minutos, 4°C. Aspirou-se o sobrenadante (descarte) e ressuspendeu-se o *pellet* em 100 -200µL de PBS.

Uma alíquota do material foi utilizada para quantificação de proteínas totais pelo BCA™ Protein Assay Kit (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, e o restante aliquoteado e estocado à -80°C para posterior uso nos ensaios biológicos.

3.4 Caracterização das vesículas extracelulares

3.4.1 *Western Blot*

A caracterização das vesículas extracelulares, enriquecidas de vesículas menores (*exosomes-like*), foi realizada através da identificação de tetraspaninas CD63 e CD9 relacionadas à biogênese de exossomos, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD63 e anti-CD9 (BD-Biosciences) e anticorpo secundário anti-IgG2a de camundongo, kappa (Abcam). Como controle endógeno foi realizada a marcação para anti-GAPDH (eBioscience). As vesículas extracelulares foram lisadas com Tampão Ripa 1X (Sigma) na presença de inibidores de protease (Sigma). A cada 50 µL da amostra, foram adicionados 50 µL de Tampão Ripa. Para cada 100 µL da mistura adicionou-se 1 µL de inibidor de protease e submeteu-se o homogenato a 3 ciclos vórtex/gelo, de 10 segundos cada, para lise das EVs. A quantificação de proteínas do material lisado foi realizada pelo kit BCA™ Protein Assay Kit (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante.

Cerca de 15 µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida com 10% de docecil sulfato de sódio (SDS) em tampão de corrida (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS). Foi realizada a transferência das proteínas presentes nas amostras para membranas de nitrocelulose (Termo Scientific), utilizando-se o sistema de transferência (Loccus Biotecnologia) com tensão de 24V, *overnight* (na câmara fria) em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol). A eficiência de transferência de proteínas à membrana foi evidenciada pela coloração com Vermelho de Ponceau (50 mg de ponceau, 2,5 mL de ácido acético em volume final de 50 mL completado com água destilada). Após a transferência, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose através da incubação da mesma com 3% BSA em tTBS (Tris-HCl, pH 7,5 100 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%) por 1 hora, 4°C, sob suave agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas a 4°C com os anticorpos monoclonais anti-CD63 (1:1000) (BD-Biosciences), anti-CD9 (1:2000) (BD-Biosciences), anti-CD81 (1:2000) (BD-Biosciences), anti-GAPDH (1:3000) (eBioscience) por 1 hora e 30 minutos.

Decorrido o tempo, a membrana foi lavada 3 vezes com tTBS, 10 minutos cada, e incubada com anticorpo secundário anti-IgG2a de camundongo (Abcam) na diluição de 1:7500, por 1 hora. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos cada com tTBS, 2 vezes com PBS e revelada por método de quimioluminescente. Para isso, foram utilizadas duas soluções nas mesmas proporções (Solução 1: Tris 100 mM [pH 8,5], Luminol 2,5 mM e ácido p-cumárico 0,396 mM; Solução 2: Tris 100 mM [pH 8,5], e H₂O₂ 0,06%). A identificação de reação positiva pôde ser visualizada após 10 minutos de exposição à mistura e a captura sinais de quimioluminescência foi realizada utilizando o equipamento ImageQuant LAS 4000 series (GE Healthcare Life Sciences).

3.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise do tamanho e concentração de vesículas extracelulares resultantes do isolamento foi realizada por NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Amesbury, UK). Basicamente, uma alíquota da amostra foi diluída em PBS (1:100) e analisada no equipamento em alta resolução, a 25° C, sendo possível observar distribuição de tamanho e concentração das vesículas presentes na amostra, além de validação visual da presença de nanovesículas.

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada de acordo com Lasser *et al.*, 2012 (Lasser et al., 2012), com algumas modificações. Basicamente, 20 µg de proteínas totais (vesículas extracelulares) foram depositados em parafilme com grade de níquel revestida de formvar de carbono e deixada em contato por 60 minutos. Posteriormente, lavou-se as grades com as amostras por 3 vezes com PBS. Adicionou-se 2% formaldeído por 10 minutos no parafilme a fim de fixar a amostra. Adicionou-se 2,5% glutaraldeído no parafilme, incubou-se por 10 minutos e, posteriormente, lavou-se com PBS. O contraste foi realizado utilizando-se 2% uranila com tempo de incubação de 15 minutos. Uma gota de 0,13% metilcelulose e 0,4% acetato de uranila foi então adicionada à grade e incubada por 10 minutos. A análise foi realizada no Microscópio Eletrônico Tecnai Spirit – FEI Company no Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP/Botucatu.

3.5 Influência das vesículas extracelulares na diferenciação de Mo-DCs

3.5.1 Processamento de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) para obtenção de monócitos

Os monócitos a serem diferenciados em células dendríticas foram obtidos a partir do processamento de PBMCs de doadores saudáveis. Cerca de 50 mL de sangue periférico coletado em tubos com o anticoagulante heparina foram processados utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Para cada 30 mL de sangue, foram utilizados 15mL de Ficoll-Paque Plus. Basicamente, após adição de Ficoll-Paque Plus ao sangue na proporção Sangue-Ficoll (2:1), os tubos foram centrifugados a 900g por 40 minutos, a 18° C, utilizando a taxa de desaceleração da centrífuga em zero para obtenção das frações. A camada de referente às células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foi cuidadosamente coletada e transferida a um novo tubo estéril juntamente com 30 mL de PBS e centrifugada a 400g por 10 minutos. As PBMCs foram lavadas por mais 2 vezes a 300g. O pellet foi coletado e as células

ressuspendidas em meio RPMI incompleto. A contagem de células viáveis foi realizada utilizando o corante azul de trypan 0,4% para visualização de possíveis células mortas.

Células viáveis, na concentração de 2×10^6 por poço, foram plaqueadas e mantidas em estufa de CO₂ (5%) por 2h ou *overnight* a 37° C, em 500 µL de meio RPMI incompleto, para aderência dos monócitos. Após esse período, o sobrenadante com as células não aderentes foi retirado, lavou-se as células aderidas e adicionou-se o meio de diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DCs).

3.5.2 Diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DCs)

A diferenciação de monócitos a células dendríticas foi induzida pela adição das citocinas GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (50 ng/mL) (ImmunoTools). Para avaliação dos efeitos das vesículas extracelulares isoladas na diferenciação de Mo-DCs, estas foram adicionadas no primeiro dia de diferenciação, juntamente com as citocinas, na concentração de 30 µg. As células foram cultivadas por 5 dias em estufa a 37°C com atmosfera saturada de água e 5% de CO₂. Para controle de diferenciação, em alguns poços foi adicionado meio de diferenciação contendo as citocinas, sem vesículas extracelulares.

No quinto dia de diferenciação, foi adicionado 50 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma) para maturação das células dendríticas imaturas (iDC) e obtenção, portanto, de células dendríticas maduras (mDCs). Após 48 horas do estímulo com LPS, as Mo-DCs foram destacadas dos poços utilizando-se uma solução de PBS-EDTA 4 mM, em gelo.

O sobrenadante de cultura ao final do processo de diferenciação e maturação foi coletado e armazenado a -20° C para posterior análise de citocinas. O diagrama experimental representativo está descrito na Figura 7.

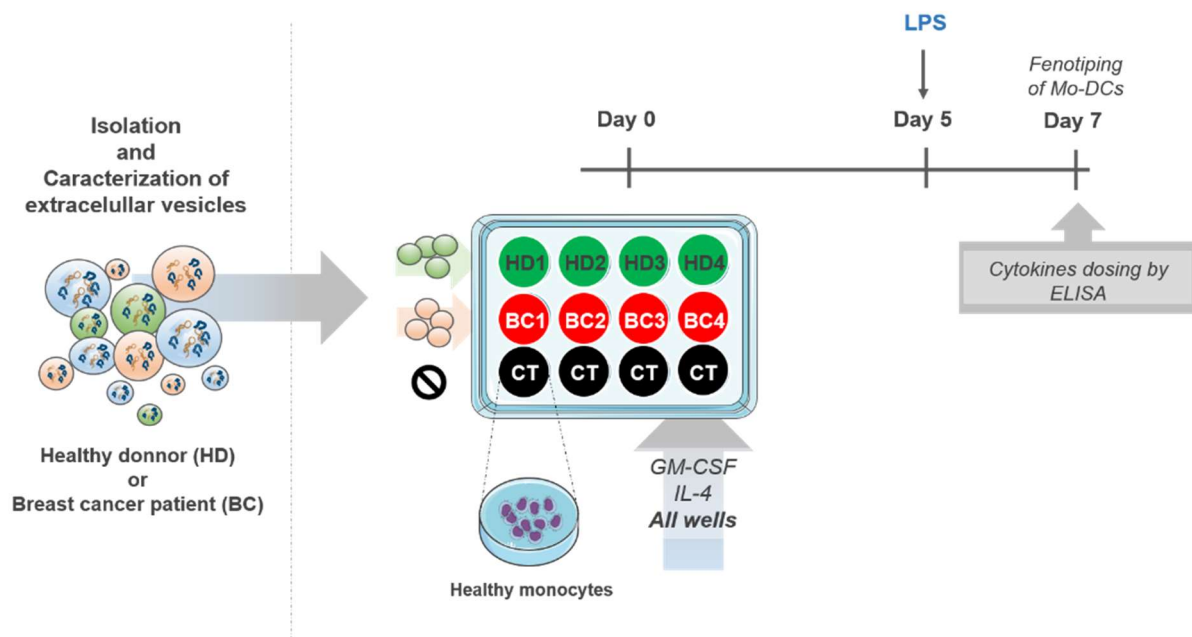


Figura 7 - Desenho experimental da avaliação da influência de vesículas extracelulares na diferenciação de Mo-DCs. Nos grupos experimentais, 30µg de exossomos seja de doador saudável (HD, do inglês *healthy donor*), paciente com cancer de mama (BC, do inglês *breast cancer*) ou de linhagem celular (não representado) foram adicionados juntamente com as citocinas de diferenciação IL-4 (50ng/mL) e GM-CSF (50ng/mL). Nos poços CT, (do inglês *control*), a diferenciação ocorreu na ausência de vesículas. Todas as Mo-DCs geradas foram maturadas com LPS (50ng/mL) no 5 dia. No sétimo dia de cultura, as Mo-DCs geradas foram são fenotipadas e o sobrenadante de cultura obtido para dosagem de citocinas.

3.5.3 Análise fenotípica por citometria de fluxo

A determinação do fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na ausência e presença de vesículas extracelulares de doadores saudáveis, de pacientes com câncer de mama ou de sobrenadante de cultura celular foi realizada através da análise da expressão de diferentes marcadores por citometria de fluxo. Para isso, as Mo-DCs foram desaderidas das placas com o uso de uma solução de PBS-EDTA 4 mM, em gelo. Cerca de 5×10^4 células, de cada condição experimental, foram destinadas a ensaios funcionais e o restante das células foram destinadas a análise fenotípica por citometria de fluxo.

Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com o corante Live/Dead diluição 1:1000, Life Technologies, # L34955), no escuro, gelo, por 10 minutos, e posteriormente lavou-se as células para remoção de corante livre. Posteriormente, procedeu-se com a marcação de anticorpos extracelulares para fenotipagem das Mo-DC por 30 minutos, a temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD11c-AmCyam (diluição 1:160, Biolegend, #301634), anti-HLA-DR-APC (diluição 1:160, Biolegend, #307610), anti-CD80-FITC (diluição 1:160, Biolegend, #305206), anti-CD86-PercP (diluição 1:320, Biolegend, #305420). Após marcação, as células foram lavadas novamente para remoção de anticorpos

livres, e ressuspendidas em 200 μ L de tampão FACS 2% (PBS, 2% de SFB). A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo – LSRFortessa com o software FACSDiva (BD Biosciences), no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), do Departamento de Análises Clínicas e Toxológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os dados obtidos foram analisados com o *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

3.6 Ensaio funcional das Mo-DCs geradas

3.6.1 Separação de linfócitos T alogênicos

Os linfócitos T alogênicos foram obtidos através da separação de células CD4⁺ e CD8⁺ de doadores saudáveis no citômetro FACSAria II (BD) localizado na Plataforma de Citometria do Instituto René Rachou, Belo-Horizonte. Inicialmente, PBMCs foram obtidas como descrito no item 4.5.1 e foram marcadas extracelularmente com anticorpos anti-CD4-PercP-Cy5.5 (ImmunoTools, #21278045) e anti-CD8-APC (eBioscience, #17-0087-42) humanos. Resumidamente, as PBMCs foram lavadas e ressuspendidas em 100 μ L da solução contendo os anticorpos anti-CD4 (diluição 1:20) e anti-CD8 (diluição 1:1000). Incubou-se as células na solução com anticorpos por 30 minutos, temperatura ambiente e na ausência de luz. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com tampão FACS 2% a 300g por 10 minutos. As células foram ressuspendidas em tampão FACS 2%, filtradas em cell strainer de 40 μ m e separadas de acordo com a positividade para CD4 e CD8 no citômetro FACSAria II (BD) (Figura 8). Após a separação, as células CD4⁺ e CD8⁺ foram misturadas, lavadas com PBS a 300g por 10 minutos, contadas e marcadas com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil (CFSE) para ensaio de proliferação celular.

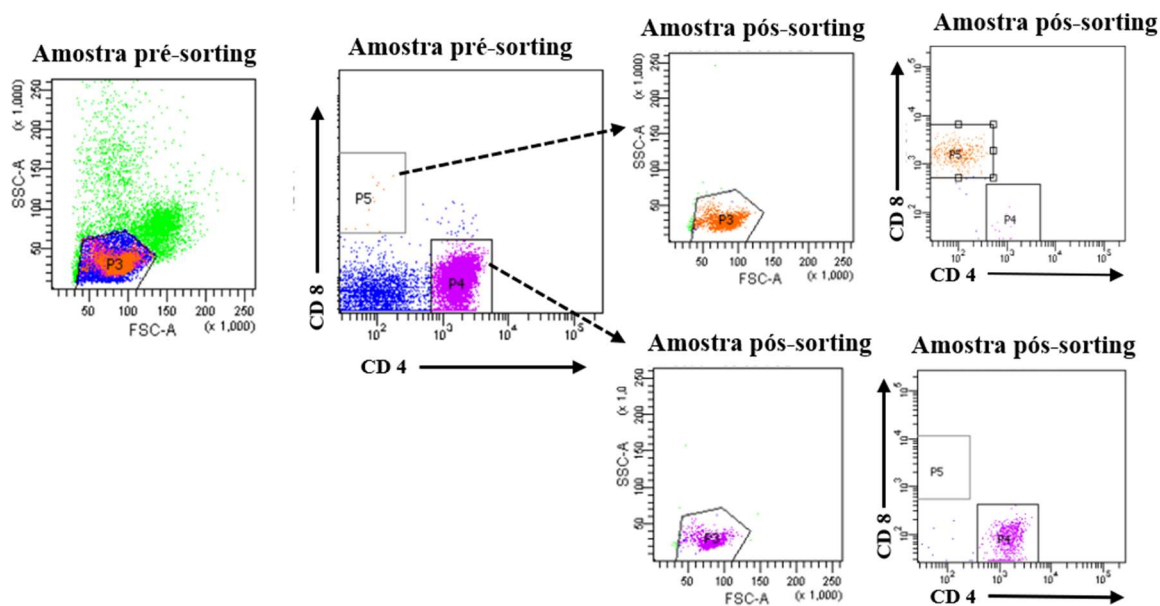


Figura 8 - Dot plot representativo da separação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ humanos no FACSaria II (BD). O padrão das células pré-sort, de acordo com granulosidade (SSC-A) e tamanho (FSC-A) e positividade para CD4 (PercP-Cy5.5) e CD8 (APC) estão representados à esquerda. Os gráficos à direita representam as células após sorteamento, demonstrando a eficiência e acurácia do sorteamento.

3.6.2 Análise do perfil resposta imune adaptativa induzida e proliferação de linfócitos

As Mo-DCs geradas foram avaliadas quanto a capacidade de induzir resposta imune adaptativa através de uma reação mista de linfócitos (MLR). Para realização do teste, os linfócitos T obtidos após sorteamento de células, descritos no item 3.6.1, foram incubados em meio RPMI incompleto, contendo 5 μ M de Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster (CFSE), a 37°C, no escuro, por 10 minutos, como descrito por Lyons & Parish em 1994 (Lyons and Parish, 1994). Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino para inativação da marcação e remoção de corante livre.

Os linfócitos marcados com CFSE (1×10^5 células) foram, então, co-cultivados com 1×10^4 Mo-DCs (proporção de 10:1) geradas em cada condição experimental, separadamente, em triplicata. Após 5 dias de co-cultura, as células totais de cada poço foram marcadas utilizando painel descrito baixo para avaliação da proliferação de linfócitos T. O perfil da resposta imune estimulada, fenótipo celular e produção de citocinas por células T também foram avaliadas por citometria de fluxo. O painel de anticorpos contendo as especificações de cada um está descrito na tabela 1. O diagrama experimental representativo está descrito na Figura 9. O sobrenadante da co-cultura foi coletado ao final do experimento

para posterior análise do perfil de citocinas secretadas.

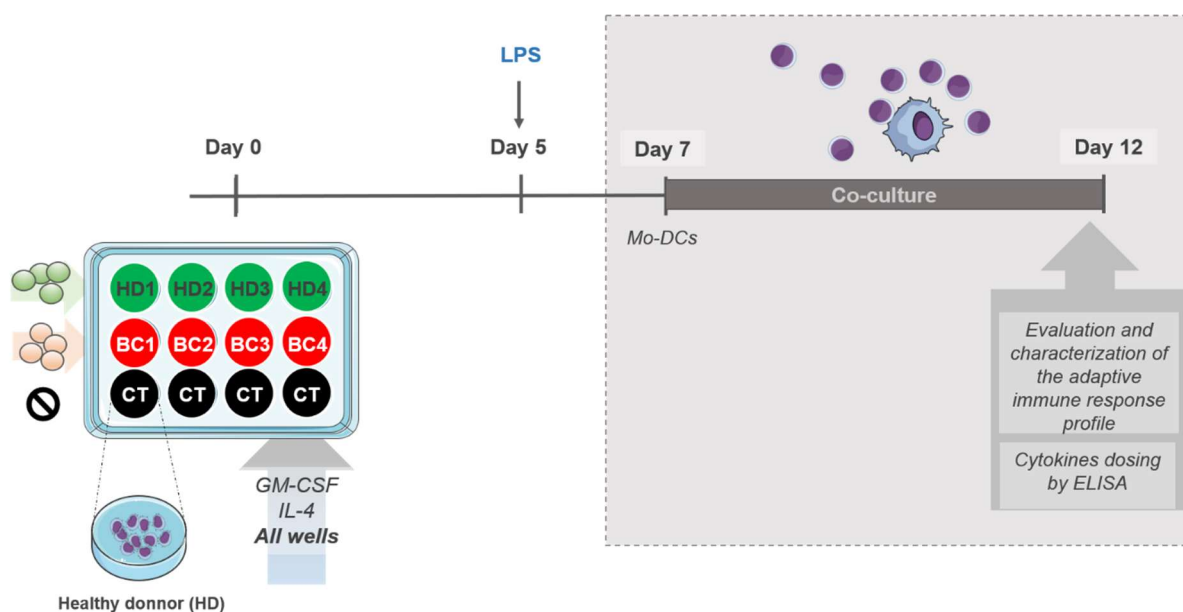


Figura 9 - Desenho experimental da o ensaio funcional das Mo-DCs geradas na presença e ausência de vesículas extracelulares. Mo-DCs foram diferenciadas na presença de EVs de doador saudável (HD, do inglês *healthy donor*), paciente com câncer de mama (BC, do inglês *breast cancer*) ou de linhagem celular (não representado) e citocinas de diferenciação IL-4 (50ng/mL) e GM-CSF (50ng/mL). Nos poços CT, (do inglês *control*), a diferenciação ocorreu na ausência de vesículas. Todas as Mo-DCs geradas foram maturadas com LPS (50ng/mL) no 5 dia. No sétimo dia, as Mo-DCs geradas foram co-cultivadas com linfócitos T alogênicos por 5 dias e, ao final, o perfil resposta imune adaptativa induzida foi avaliada e o sobrenadante de cultura foi utilizado para dosagem de citocinas secretadas.

Tabela 1 - Descrição dos Anticorpos utilizados para avaliação de proliferação celular e caracterização do ensaio funcional de proliferação de linfócitos alogênicos

Painel 1 – avaliação da proliferação e citocinas*				
	Conjugado	Diluição	Código	Empresa
Anti-CD4	V450	1:160	48004842	eBioscience
Anti-CD8	Bv570	1:20.000	301038	Biologend
Anti-CD3	V655	1:40	317324	Biologend
Anti-CD25	V605	1:20	302632	Biologend
Anti-CD127	APC/Cy7	1:50	351350	Biologend
Anti-IL-10	PE	1:100	506804	Biologend
Anti-IFN-gama	PE/Cy7	1:500	557844	BD
Anti- IL-2	APC	1:220	17702982	eBioscience
Anti-TNFa	Ax700	1:20	RHTNFA24	Invitrogen
Anti-Foxp3	Pe/Dazzle	1:20	320126	Biologend

Painel 2 – avaliação de fenótipo de Treg*				
	Conjugado	Diluição	Catálogo	Marca
Anti-CD4	V450	1:160	48004842	eBioscience
Anti-CD8	Bv570	1:20000	301038	Biolegend
Anti-CD3	V655	1:40	317324	Biolegend
Anti-PD-1	V605	1:1000	329924	Biolegend
Anti-CD127	PE	1:200	557938	BD
Anti-LAP	PercP	1:25	FAB2463C	R&D
Anti-CTLA-4	PE/Cy7	1:600	349914	Biolegend
Anti-CD25	Ax700	1:20	356118	Biolegend
Anti-Foxp3	Pe/Dazzle	1:20	320126	Biolegend

*Células T do início do experimento, marcadas com CFSE. Portanto, a proliferação celular dentro das subpopulações de linfócitos T pode ser verificada observando a positividade para CFSE (lido no canal de FITC).

3.6.3 Análise na interferência de doador de monócito para geração de Mo-DCs e defeitos funcionais gerados

Para verificar se a modulação do fenótipo tolerogênico induzido nas Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama, monócitos de indivíduos saudáveis foram induzidos a diferenciarem-se em Mo-DCs na presença de EVs de pacientes ou controles e as mesmas usadas em ensaio funcional de proliferação de linfócitos alogênicos. Dose de EVs e delineamento experimental foram os mesmos ao descrito nos itens 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.6.1 e 3.6.2.

3.7 Detecção da produção de citocinas em sobrenadante de cultura

A dosagem de citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) no sobrenadante após 5 dias de co-cultura de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de doadores saudáveis ou pacientes com câncer de mama e linfócitos T alogênicos (MLR). Foram dosadas IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN-gama (Biolegend), segundo as instruções do fabricante.

3.8 Avaliação de vias de sinalização mTOR e NF- κ B após maturação das Mo-DCs geradas *in vitro*

Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de doadores saudáveis ou de pacientes com câncer de mama foram ativadas com LPS e lisadas em tampão de lise RIPA, contendo inibidor de protease, após 5 e 30 minutos. Proteínas relacionadas às vias de sinalização de mTOR e NF- κ B foram detectadas através de Western-Blot. Para isso, a concentração proteica de cada amostra foi determinada através do kit BCATM Protein Assay Kit (Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, e 20 μ g de proteínas de cada amostra foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE a 10%. As proteínas foram posteriormente transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). A membrana foi bloqueada utilizando solução de 3% de leite desnatado em 0,05% de tTBS por 1 hora à temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpos primários (1: 1000) durante a noite a 4° C. Após três lavagens com tTBS, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase apropriados (1: 3000) por 1 hora à temperatura ambiente. Os resultados foram visualizados com adição do substrato HRP Immobilon[®] Forte Western (Millipore) à membrana e as imagens foram capturadas por quimioluminescência no ImageQuant LAS 4000 series (GE Healthcare Life Sciences).

3.9 Avaliação de miRNAs em vesículas extracelulares

3.9.1 Levantamento bibliográfico de miRNAs relacionados com câncer de mama e possíveis alvos

Primeiramente, foi realizado um levantamento bibliográfico de possíveis miRNAs identificados e validados como altamente expressos no sangue de indivíduos com câncer de mama em artigos publicados no PUBMED. Após isso, verificou-se se os miRNAs poderiam modular proteínas nas quais foram observadas alterações que diferencialmente expressas em Mo-DCs derivadas na presença de EVs de pacientes ou saudáveis como CD80, CD86, HLA-DR e CD11c e proteínas da via de sinalização de mTOR, incluindo o pmTOR, GSK-3 β , pp70S6K e PTEN. Para isso, foram utilizadas as ferramentas online TargetScan (Agarwal et al., 2015) e miRDB (Wong and Wang, 2015).

3.9.2 Isolamento de miRNAs de vesículas extracelulares

Os miRNAs foram isolados de EVs utilizando o kit miRNeasy Serum/Plasma (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as EVs foram lisadas utilizando o QUIazol fornecido pelo kit e a formação da fase orgânica e aquosa foi obtida adicionando-se clorofórmio. A fase aquosa (contendo miRNAs), foi transferida para colunas

fornecidas no kit para retenção de RNAs, que foram posteriormente lavados e eluído utilizando água livre de RNase. A concentração de RNA total foi determinada através de absorbância no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.9.3 Conversão do miRNA em cDNA e reação de qPCR

Os miRNAs foram convertidos a cDNA utilizando o kit miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Basicamente, como miRNAs são muito pequenos, é necessário o alongamento deles através de uma reação de poliadenilação na região 3'. Além da inserção da sequência poli-A, na reação de cDNA, um primer adaptador para transcriptase reversa também é inserido na extremidade 5' e contém bases adicionais que criam uma tag de sequência universal em cada cadeia de cDNA sintetizada. Para síntese de cDNA, foram utilizados 200 ng de RNA por reação, dentro da faixa de sensibilidade segura do kit.

Para identificação específica de miRNAs presentes nas amostras, foi utilizado o primer universal (que se liga na tag universal na porção 5' dos cDNAs sintetizados), primer específico para cada miRNA, 6 ng de cDNA, miScript SYBR Green PCR e água para aferir volume de reação a 15µL. A tabela 2 contém os primers avaliados nas amostras, com suas respectivas sequências e condições de reação.

Tabela 2 - Detalhamento das sequencia e concentrações dos primers utilizados no ensaio de qPCR

miRNA	Sentido	Concentração	Sequencia
Universal	Foward	800 nM	Fornecido no KIT miRNA First-Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific)
U6	Reverse	800 nM	GGG CAG GAA GAG GGC CTA T
hsa-miR-181b-5p	Reverse	800 nM	AAC ATT CAT TGC TGT CGG TGG GT
hsa-miR-16-5p	Reverse	400 nM	TAG CAG CAC GTA AAT ATT GGC G
hsa-miR-15a-5p	Reverse	400 nM	TAG CAG CAC ATA ATG GTT TGT G
hsa-miR-29b-3p	Reverse	400 nM	TAG CAC CAT TTG AAA TCA GTG TT
hsa-miR-24-3p	Reverse	800 nM	TGG CTC AGT TCA GCA GGA ACA G
hsa-miR-19a-3p	Reverse	400 nM	TGT GCA AAT CTA TGC AAA ACT GA
hsa-miR-21-5p	Reverse	800 nM	TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A
hsa-miR-92a-3p	Reverse	800 nM	TAT TGC ACT TGT CCC GGC CTG T
hsa-miR-10a-5p	Reverse	400 nM	TAC CCT GTA GAT CCG AAT TTG TG
hsa-miR-10b-5p	Reverse	400 nM	TAC CCT GTA GAA CCG AAT TTG TG
hsa-miR-155-5p	Reverse	800 nM	TTA ATG CTA ATC GTG ATA GGG GT

O protocolo de PCR correspondeu a 5 minutos de desnaturação a 95° C e 60 ciclos de 1 min para anelamento e alongação a 60° C, seguidos de 10 segundos de desnaturação a 95° C. A fluorescência foi detectada ao final de cada fase de extensão. Para excluir a contaminação de produtos inespecíficos da PCR tais como dímeros de primer, a análise da curva de dissociação foi aplicada a todos os produtos no final da ciclagem. O controle endógeno utilizado foi U6 a fim de se correlacionar e quantificar relativamente a expressão dos miRNAs analisados. A quantificação relativa foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.10 Avaliação da modulação do fenotípica de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de cultura de células tumorais humanas

O fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de células de linhagens normais e linhagens tumorais de mama humanas foi avaliado a fim de verificar se os efeitos observados poderiam ser provenientes, de fato, de EVs liberadas pelo tumor. Para isso, foram utilizadas 3 linhagens humanas: HEK-293 (ATCC CRL-1573), célula epitelial de rim; MCF-7 (ATCC HTB-22), célula epitelial adenocarcinoma mamário humano luminal e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), célula epitelial de adenocarcinoma humano triplo negativa.

Para isolamento de vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura, as células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM l-glutamina (Invitrogen) e 1% penicilina/streptomicina (100 unidades/mL) a 37°C com atmosfera saturada de água e 5% de CO₂. Quando as células atingiram -60-70% de confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄] e foi adicionado meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino ultracentrifugado (100.000 g/ 8 horas), 2mM l-glutamina (Invitrogen) e 1% penicilina/streptomicina (100 unidades/mL) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera saturada de água e 5% de CO₂. A troca de meio por um meio suplementado com soro fetal bovino ultracentrifugado é necessária para a remoção das vesículas extracelulares presentes e, ao isolar VEs da do sobrenadante, obter apenas aqueles oriundos das células em cultivo. Ao atingir a confluência, o sobrenadante de cultura foi coletado para posterior isolamento de VEs como descrito no item 3.3.2.

3.11 Avaliação da modulação sistêmica da resposta imune por vesículas extracelulares tumorais *in vivo*

3.11.1 Animais

Camundongos Balb/c fêmeas, selvagens, com 6 a 8 semanas foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos durante experimentação animal no Biotério do Departamento de Bioquímica - Sala Prof. Ênio Cardillo Vieira - ICB/UFGM, com controle de temperatura e luz com oferta *ad libitum* de água e ração padrão. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos institucionais e internacionais que regulam a experimentação em animais (protocolo CEUA 123 / 2019).

3.11.2 Isolamento de EVs do sobrenadante de cultura de células 4T1

Para isolamento de vesículas extracelulares do sobrenadante de cultura da linhagem de carcinoma mamário murino metastático triplo negativo 4T1 (ATCC CRL-2539), as células foram mantidas da forma como descrito no item 3.10 e o isolamento foi realizado como descrito no item 3.3.2.

3.11.3 Avaliação do fenótipo de células dendríticas e macrófagos no baço após injeção de EVs de 4T1

Animais BALB/c receberam EVs isoladas do sobrenadante de cultura de células 4T1 de forma intravenosa pela cauda. Para facilitar a injeção das EVs, a veia caudal dos animais foi dilatada, colocando-a em recipiente com água morna (30-35° C), durante 5 minutos. Foram injetadas 20 µg de EVs ou PBS (controle) a cada 48 horas, durante 10 dias. No último dia, os animais foram eutanasiados e o baço foi coletado para análise de células mieloides e linfoides.

Para análise de células mieloides, foi utilizado o anti-Fc-γ III/II CD16/32 (1:50) e os marcadores de superfície: anti-CD11b-APC (diluição 1:500, Biolegend, # 101212), anti-CD45-Bv-570 (diluição 1:500, Biolegend, # 103136), anti-Ly6C-Bv605 (diluição 1:330, Biolegend, #128036), anti-Ly6G-PE (diluição 1:800, Biolegend, # 127607), anti-IA/IE-FITC (diluição 1:160, BD, # 553623), anti-CD11c-PercP (diluição 1:350, BD, # 560584), anti-F4/80-PE/Cy7 (diluição 1:350, eBioscience, # 25-4801-82) e anti-CD86-AmCyan (diluição 1:200, BD, # 563077).

Para a análise de células linfoides, foi utilizado o anti-Fc-γ III/II CD16/32 (1:50) e os marcadores: anti-CD45-Bv-570 (diluição 1:500, Biolegend, # 103136), anti-CD3-APC-Cy7 (diluição 1:80, Biolegend, # 100222), anti-CD4-PE/Cy-7 (diluição 1:300, Biolegend, # 116016,

anti-CD8-PercP (diluição 1:500, Biolegend, # 100734), anti-FoxP3-Ax700 (diluição 1:100, eBioscience, #56577382) e anti-Ki-67-FITC (diluição 1:40, Biolegend, #652410).

As marcações extracelulares foram realizadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Para marcação intracelular necessária no painel de resposta imune adaptativa, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, #00-5523-00), de acordo com as instruções do fabricante. No final, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão FACS 2%. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo – LSRFortessa com o software FACSDiva (BD Biosciences), no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os dados obtidos foram analisados com o *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

3.11.4 Indução de Carcinoma mamário murino 4T1

As células de carcinoma mamário murino metastático triplo negativo 4T1 foram utilizadas para indução de tumor em animais BALB/c. Para indução de tumor mamário, as células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM l-glutamina (Invitrogen) e 1% penicilina/streptomicina (100 unidades/mL) a 37°C com atmosfera saturada de água e 5% de CO₂ até atingirem a 3ª passagem, através de 2 repiques sucessivos após atingir confluência. Portanto, quando as células atingiram 30% de confluência e estavam na 3ª passagem, elas foram desaderidas com a utilização de uma solução de 0,25% Tripsina com 1mM de EDTA (Sigma Aldrich), as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄] e contadas com auxílio do corante azul de trypan 0,4% para visualização de possíveis células mortas.

Para injeção das células, os animais foram previamente anestesiados e 50 uL de suspensão contendo 7x10³ células 4T1 foram injetados na glândula mamária abdominal esquerda. O crescimento tumoral foi avaliado a cada 3-4 dias com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil).

3.11.5 Obtenção de *Leishmania major*

Promastigotas de *Leishmania major* (cepa MHOM/IL/80/Fredlin) foram gentilmente cultivados no laboratório Gnotobiologia e Imunologia, coordenado pela profa. Dra. Leda Quercia Vieira (ICB/UFMG) e fornecidas para os experimentos *in vivo*.

Resumidamente, para isolamento dos parasitos, foram utilizados camundongos BALB/c, previamente infectados na pata com *L. major*. Para o isolamento das culturas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool 70%. Em seguida, com o auxílio de uma seringa com agulha de calibre 26 G1/2, foi realizada a punção das patas infectadas e o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio Grace's (GIBCO) completo. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada de 1:4 dos parasitos, até atingir 16 poços. A placa foi selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP). As promastigotas de *L. major* foram mantidas em estufa BOD 25°C, repicadas a cada dois ou três dias, até realização dos experimentos desde que não ultrapassasse 10 repiques.

3.11.6 Infecção dos animais com *L. major*

Para realização das infecções foram utilizadas 1×10^5 formas promastigotas metacíclicas do parasito, com cinco dias de cultura. As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos da fase estacionária através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (Spath and Beverley, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento ressuspendido em 2 mL de PBS, sendo este transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Esse material foi centrifugado a 1.250 g por 10 minutos, a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada duas vezes com PBS antes de ser usada para a infecção. O volume do inóculo injetado na orelha dos camundongos foi de 10µL na face anterior da orelha bilateralmente. A lesão induzida foi acompanhada semanalmente, com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Itu, SP, Brasil) e imagens foram capturadas no estero microscópio SMZ745T (Nikon) no aumento de 0,65 X.

3.11.7 Quantificação dos parasitos

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante (Vieira et al., 1996), em que diluições sucessivas são feitas a partir dos homogenatos dos órgãos

infectadas dos camundongos experimentais. No experimento realizado, a orelha, baço e fígado foram coletados para quantificação de parasitas. Primeiramente, as amostras foram maceradas em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a 50g por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a 2000g por 15 minutos, e o sedimento resultante foi suspenso em 400µL de meio 199 (GIBCO). Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio de Grace's (GIBCO completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200 µL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitas e um consequente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e observação dos resultados foi realizada após 10 dias do início da cultura.

3.11.8 Análise do infiltrado inflamatório nas orelhas infectadas por citometria de fluxo

As orelhas dos camundongos infectados com *L. major* foram coletadas após eutanásia dos animais. As orelhas foram fracionadas em pedaços menores e incubadas por 90 minutos em 1 mL de meio RPMI (GIBCO) sem SFB contendo 62,5 µg/mL de liberase TL (Roche) e 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich). Decorrido o tempo, foi adicionado 1mL de RPMI 10% SFB por amostra, para inativação da liberase. As amostras foram então maceradas, e o homogenato centrifugado a 400g por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, o *pellet* (células) foram utilizadas para análise por citometria de fluxo. Para análise, as células foram marcadas primeiramente com Live/Dead (1:1000, Life Technologies, #L34955), por 10 minutos, no gelo e ausência de luz. Posteriormente, as células foram lavadas e divididas em duas frações para painéis de células mieloides e linfoides, descritos no item 3.11.3.

As marcações extracelulares foram realizadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Para marcação intracelular necessária no painel de resposta imune adaptativa, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, #00-5523-00), de acordo com as instruções do fabricante. No final, as células foram lavadas e ressuspendidas em tampão FACS2%. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo – LSRFortessa com o software FACSDiva (BD Biosciences), no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), do Departamento de Análises Clínicas e Toxológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os dados obtidos foram analisados com o *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

3.11.9 Dosagem da atividade da enzima arginase

A atividade de arginase I foi mensurada a partir do lisado de células do homogenato da orelha, como descrito por Corraliza (Corraliza et al., 1994), com algumas modificações (Kropf et al., 2005). As orelhas, infectadas ou não, foram maceradas, como descrito anteriormente, e 35 μL do homogenato obtido, foi utilizado para o ensaio. Resumidamente, as células que se encontravam no homogenato foram lisadas utilizando 50 μL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em agitação. Após a lise, 50 μL de 10 mM MnCl_2 e 50 μL de 50 mM TrisHCl (pH7,5) foram adicionados e incubou-se a mistura reacional a 55°C por 10 minutos. Em seguida, o lisado celular das orelhas foi transferido para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55 μL , e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5 μL de amostra + 45 μL de H_2O destilada). A fim de mensurar a atividade da enzima, foi adicionado às amostras o seu substrato, 50 μL de 0,5 mM de L-arginina (Sigma Aldrich) (pH 9,7). Incubou-se as amostras a 37°C por 60 minutos para reação. Em seguida, parou-se a reação com a adição de 400 μL de uma solução de ácidos ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$) na proporção de 1:3:7.

Após isso, foram adicionados 25 μL de α -isonitrosopropiofenol (Sigma Aldrich) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada novamente a 95° C por 45 minutos. A curva padrão para determinação de ureia liberada na amostra foi feita a partir da diluição seriada de uma solução padrão de ureia 1 mg/mL (Sigma Aldrich). Decorrido o tempo, 100 μL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura de absorbância a 540nm. O resultado obtido é expresso como unidade de atividade de arginase por órgão. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol uréia/minuto.

3.11.10 Grupos experimentais e visão geral do ensaio *in vivo*

Para análise do efeito de EVs na modulação sistêmica da resposta imune, foram utilizados os seguintes grupos experimentais e a os tratamentos descritos na figura 10.

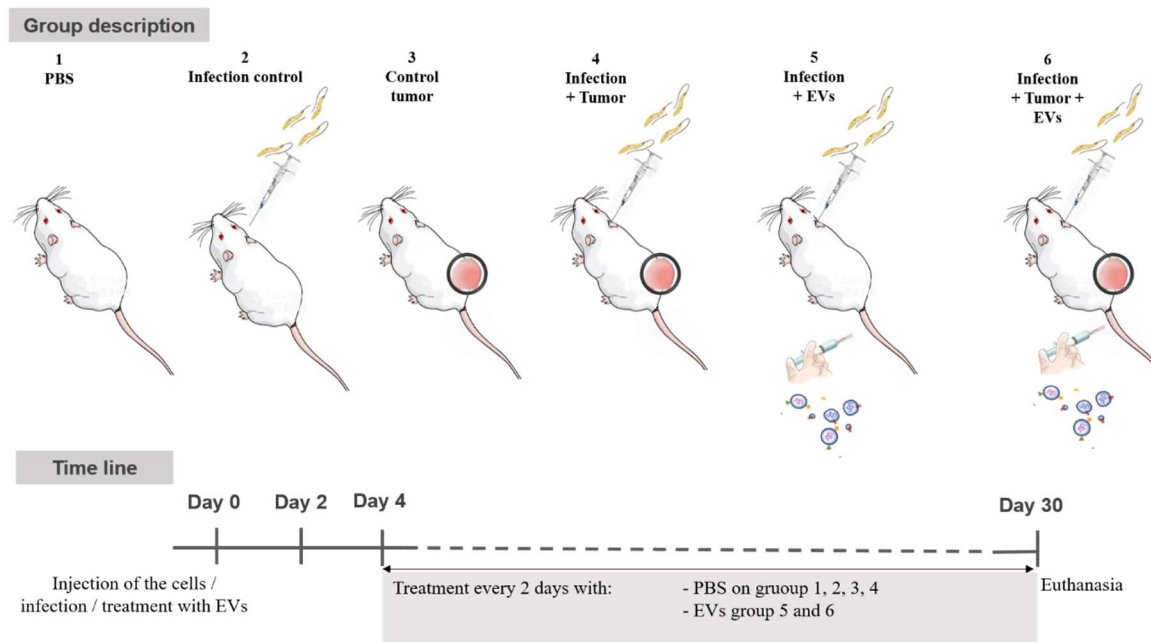


Figura 10 - Esquema representativo dos experimentos *in vivo*. Na parte superior da figura tem-se a descrição dos grupos experimentais utilizados: Grupo que recebeu apenas PBS, controle de infecção, controle de tumor murino e os grupos teste: infecção + tumor, infecção + EVs e grupo Infecção, tumor e EVs. Na parte inferior, tem-se a descrição da linha do tempo experimental contendo a estratégia de tratamento com PBS ou EVs. EVs: vesículas extracelulares.

Após eutanásia dos animais, os procedimentos descritos nos itens 3.11.7, 3.11.8 e 3.11.9 foram realizados.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov - Smirnov. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar as intensidades médias de fluorescência da presença de marcadores expressos em Mo-DCs, análise da proliferação de células T, testes *in vivo* e perfil de secreção de citocinas. O teste de Tukey foi usado como pós-teste para identificação de diferença significativa entre as amostras independentes. As análises foram realizadas através do Software GraphPad Prism 7.04, e valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. A análise de similaridade entre amostras quanto à expressão gênica foi analisada pelo teste *Euclidean distance* e a análise foi realizada através do Software DataAssist v3.01.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das amostras biológicas obtidas

Foram obtidas 20 amostras de doadoras saudáveis e 30 amostras de pacientes com câncer de mama para o desenvolvimento da tese. Na tabela 3 estão descritas as informações de

cada grupo amostral. Pode-se observar que as idades entre os dois grupos foram semelhantes, bem como todas as doadoras foram do sexo feminino. Aproximadamente 50% das doadoras estavam em menopausa, frequência muito próxima do grupo com câncer de mama, e a grande maioria das participantes de ambos os grupos possuía histórico familiar de câncer (incluindo mama, útero, ovário, fígado, cérebro, intestino e próstata). No grupo de pacientes com câncer de mama, todas estavam sem tratamento (cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico), não possuíam metástase ou eram reincidentes.

Tabela 3 - Informações das amostras de doadoras saudáveis e pacientes com câncer utilizadas nos ensaios.

Subdivisão	Doadoras saudáveis	Pacientes com câncer de mama
Nº de indivíduos	20	30
Média de idade (anos)	56 (± 6)	60 (± 11)
Menopausa	Sim (50%)	Sim (47%)
Primeira gravidez acima de 30 anos	50%	60%
Não possui filhos	10%	14%
Tipo de câncer	-	Her2 (10%), <i>Basal-like</i> (17%), Luminal A e B (73%)
Histórico familiar	Sim (75%)	Sim (85%)

Fem: sexo feminino; Masc: sexo masculino.

A menopausa é a interrupção da menstruação por 12 meses consecutivos, resultante da deficiência de estrogênio e não está associada a uma patologia. Geralmente começa entre 51 e 52 anos (Sapre and Thakur, 2014). No entanto, cerca de 5% das mulheres experimentam menopausa precoce entre 40 e 45 anos. Além disso, 1% das mulheres experimentam menopausa prematura antes dos 40 anos, devido à insuficiência ovariana permanente que pode estar associada a anormalidades cromossômicas sexuais (Burkard et al., 2019).

Não existem estudos que comprovam que a menopausa causa câncer, mas o risco de desenvolvê-lo aumenta à medida que a mulher envelhece (Butt et al., 2012). Uma mulher que inicia a menopausa após os 55 anos tem um risco aumentado de câncer de ovário, mama e útero. O risco aumenta se ainda a mulher possuir mutações germinativas, como em *BRCA1* e *BRCA2*. Além disso, outro fator de risco é o início da menstruação em idade anterior aos 12 anos, possivelmente pelo tempo maior de exposição ao estrógeno (Butt et al., 2012). Em contrapartida, idade precoce da primeira gravidez a termo já foi descrita em ser inversamente relacionada ao risco de câncer de mama (Chie et al., 2000). Essa associação talvez reflita a maturação induzida pela gravidez das células mamárias, tornando-as menos suscetíveis à

transformação carcinogênica. Outra possível explicação seria a alteração hormonal duradoura induzida, ou ainda, uma associação desses efeitos (Surakasula et al., 2014). Neste estudo, verificou-se que a maioria das mulheres do grupo amostral com câncer de mama tinham 30 anos ou mais de idade na primeira gravidez (60%) ou não possuíam filhos (14%), percentagens semelhantes ao grupo controle. Em homens, o câncer de mama também acontece, porém, em menor incidência. Os fatores de risco apontados para o desenvolvimento de câncer de mama em homens são: altos níveis de hormônio estrógeno e mutações genéticas germinativas, principalmente em BRCA2 (<https://www.nationalbreastcancer.org/male-breast-cancer>, acessado em 10 de julho de 2020).

Quanto à representatividade dos tipos moleculares de classificação de câncer de mama no grupo amostral obtido de pacientes, pode-se observar que reflete com incidência relativa a cada subtipo. O subtipo luminal A e B representou a grande maioria da amostra (cerca de 73%), seguido do grupo *basal-like* (17%) e Her-2 (10%). Como pode ser observado na figura 3, os tipos luminais representam, juntos, cerca de 70-80% dos casos e os demais tipos 10-15% (Harbeck et al., 2019). Portanto, a amostra obtida é representativa dos subtipos que são encontrados na população. Apesar do grupo de amostras abordado no trabalho ser de diferentes subtipos de câncer de mama, porém, todos ductais invasivos, não houve efeito diferenciado entre os subtipos.

4.2 Caracterização das vesículas extracelulares isoladas do plasma e sobrenadante de cultura

Para identificar a presença de vesículas extracelulares nas amostras obtidas após processo de isolamento e verificar se estavam enriquecidas de pequenas vesículas, como exossomos, foram utilizadas 3 técnicas distintas: rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão e *western blotting*. Os resultados representativos da caracterização das amostras constam da figura 11.

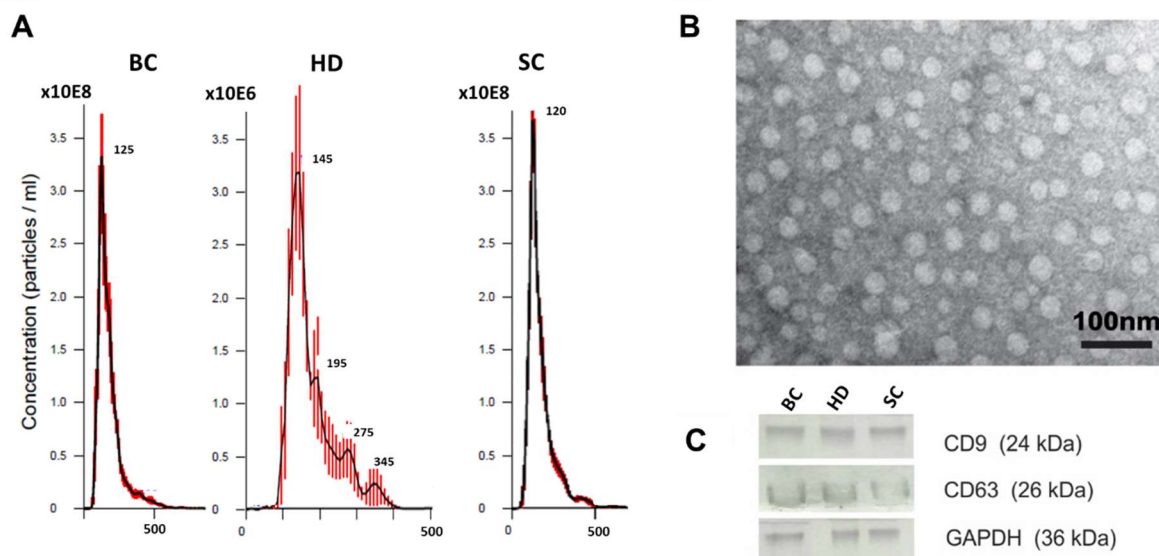


Figura 11 - Vesículas extracelulares isoladas possuem forma, tamanho e presença de marcadores relacionados aos exossomos (pequenas vesículas). Análise representativa de (A) Análise de rastreamento de nanopartículas. As vesículas foram ressuspensas em PBS e analisadas; (B) Microscopia Eletrônica de Transmissão, vesículas negativamente coradas com 2% de acetato de uranila (*barra: 100nm*). Estruturas com tamanho de 30-100 nm podem ser observadas; (C) Análise por *Western Blotting* de 30 µg de proteínas do lisado de vesículas. Foram analisadas duas tetraspaninas relacionadas na biogênese de exossomos, CD9 e CD81, e GAPDH (utilizado como controle endógeno). HD: do inglês *Healthy donor*. BC: do inglês *breast cancer*. SC: do inglês *supernatant culture*.

A avaliação das propriedades físico-químicas das EVs, como tamanho e forma, tem sido utilizada em sua caracterização. Várias técnicas têm sido rotineiramente usadas para caracterizar exossomos. Isso inclui análise de rastreamento de nanopartículas, citometria de fluxo, microscopia eletrônica e *western blotting*. No entanto, cada uma dessas técnicas tem suas próprias limitações que devem ser levadas em consideração. Devido a isso, um conjunto de técnicas para caracterização é desejável.

Métodos biofísicos podem ser usados para caracterizar a faixa de tamanho de vesículas. Através da análise de rastreamento de nanopartículas pode-se medir a distribuição de concentração e tamanho de vesículas na faixa de 10 nm a 2 µm. Neste método, através do rastreamento do movimento Browniano das nanopartículas em uma suspensão líquida, partícula por partícula, pode-se mensurar o movimento vesicular através da análise de imagens. Este movimento pode, então, ser correlacionado ao tamanho da partícula. Os resultados que podem ser extraídos são o tamanho, a distribuição do tamanho, a concentração e o fenótipo das partículas (de Necochea-Campion et al., 2018; Dragovic et al., 2011).

Na figura 11A, têm-se gráficos representativos da caracterização das EVs isoladas do plasma de pacientes com câncer (BC), doadores saudáveis (HD) e de sobrenadante de cultura (SC), neste caso, da linhagem MDA-MB-231, respectivamente.

Como pode ser observado, EVs isoladas do plasma de doadores saudáveis (HD) são mais polidispersas, ou seja, pode-se observar vesículas com tamanhos heterogêneos, quando comparadas com EVs isoladas do plasma de pacientes (BC) ou de sobrenadante de cultura celular de célula tumoral de mama (SC) (Fig. 11A). Em relação ao tamanho de EVs, as amostras isoladas de BC e de SC possuem maior similaridade de tamanho, cerca de 120 e 125nm, respectivamente. A quantificação absoluta de EVs também é possível através desta técnica e observou-se que em amostras isoladas de pacientes com câncer de mama, a partir de 10 mL de plasma, foram possível obter $6,65 \times 10^8 (\pm 1,12 \times 10^7)$ partículas/mL. Na amostra obtida através do isolamento do plasma de doadores saudáveis obteve-se $7,6 \times 10^7 (\pm 2,58 \times 10^6)$ partículas/mL, a partir de um mesmo volume de plasma. Já na amostra contendo EVs isoladas de 10 mL de sobrenadante de cultura foi possível obter $6,95 \times 10^8 (\pm 9,45 \times 10^7)$ partículas/mL.

O padrão de tamanho observado neste trabalho foi semelhante a diferentes outros trabalhos, inclusive na observação de uma maior quantidade de nanovesículas obtidas a partir de amostras de pacientes com câncer em relação a indivíduos saudáveis. Baran e colaboradores identificaram esse efeito para câncer gástrico (Baran et al., 2010), Taylor e colaboradores para câncer de ovário (Taylor and Gercel-Taylor, 2008) e Bergmann para câncer de cabeça e pescoço (Bergmann et al., 2009).

As EVs têm sido discutidas como uma ferramenta de prognóstico para avaliação da doença residual mínima no câncer de mama, além da análise de células tumorais circulantes. No estudo realizado por König e colaboradores (2017), foram investigados os níveis circulantes de EVs como marcadores substitutos para monitoramento da doença e predição de prognóstico em pacientes com câncer de mama primário, não metastático e localmente avançado. As EVs foram encontradas em maior número nas amostras de sangue de pacientes com BC antes e após a quimioterapia neoadjuvante em relação a mulheres saudáveis. Para a análise de EVs também foi realizada a verificação de tamanho e concentração através da análise de rastreamento de nanopartículas. No estudo realizado por König e colaboradores (2017), interessante, foi possível verificar uma associação do número de EVs ao *status* da doença, resposta à terapia e presença de células tumorais circulantes. Foram observados os seguintes resultados: i) a concentração das EVs foi 40 vezes maior em pacientes com BC comparada às mulheres saudáveis; ii) a concentração das EVs aumentou durante a terapia; iii) um aumento da

concentração das EVs pré-quimioterapia neoadjuvante foi associado à falha ao tratamento e iv) EVs elevadas pós-quimioterapia neoadjuvante foram associadas a uma sobrevida global livre de progressão reduzida em três anos. Portanto, a concentração de EVs circulantes em amostras de sangue de pacientes com câncer de mama pode servir como um parâmetro complementar que reflete o *status* da doença residual mínima, bem como possível predição ao sucesso da terapia e da sobrevida (Konig et al., 2017).

Outra técnica foi utilizada para a comprovação morfológica de pequenas vesículas nas amostras obtidas, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 11B). A MET é uma técnica amplamente utilizada para caracterizar a estrutura, morfologia e tamanho de vários componentes biológicos. A visualização das EVs por MET permite mensurar, por exemplo, o diâmetro vesicular. Tem que se levar em consideração que, durante o processo de preparação das amostras, que é extenso e envolve várias etapas, pode-se induzir alterações na morfologia das EVs (Gurunathan et al., 2019).

Verificou-se a presença de vesículas, de forma esférica, com tamanho variando entre 50 nm e 100 nm em todos os grupos de amostra. Na figura 11B está representada uma amostra de EVs isoladas do plasma de pacientes com câncer de mama. Características morfológicas como tamanho e forma encontradas foram semelhantes às obtidas em diferentes outros trabalhos que avaliaram EVs de pacientes com leucemia mieloide aguda (Hong et al., 2017), câncer de mama (Rupp et al., 2011), leucemia linfocítica crônica (Haderk et al., 2017) e câncer pancreático (Kahlert et al., 2014).

CD63 e CD9 são tetraspaninas presentes em exossomos e estão relacionadas à sua biogênese (Brinton et al., 2015). Em nossos estudos, foi realizada a imunodeteção de CD63 e CD9 em todas as amostras (isoladas de pacientes BC: *breast cancer* (paciente com câncer de mama) e HD: *healthy donor* doadoras saudáveis e SC: *supernatant culture* (sobrenadante de cultura – nesta imagem de MDA-MB-231) como pode ser verificado na figura 11C. Apenas em EVs isoladas de sobrenadante de cultura de MDA-MD-231 foi identificada uma baixa marcação de CD63, porém foi possível a identificação forte de CD9 caracterizando a presença de exossomos na amostra. O controle endógeno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi identificado em todas as amostras. As tetraspaninas CD9 e CD81 também foram utilizadas para caracterização e identificação de pequenas EVs em vários outros trabalhos e resultados semelhantes foram observados (Kahlert et al., 2014; Konig et al., 2017; Lasser et al., 2011; Lim et al., 2019; Rodrigues et al., 2019).

É bem estabelecido na literatura que CD9 é uma proteína marcadora de EVs. Neste sentido, por exemplo, Yoshioka e colaboradores desenvolveram um ensaio (ExoScreen) para

realização de biópsia líquida através da análises de EVs circulantes no soro de pacientes com câncer colorretal em estágio inicial. Neste ensaio pôde-se detectar especificamente EVs em soro circulante através de um ensaio homogêneo de proximidade luminescente amplificada utilizando esferas de fotossensibilizador e dois tipos de anticorpos, CD9 e CD147. Assim, não se tem necessidade de etapas de purificação. Este ensaio utilizou CD9 como alvo para capturar EVs após validar outras proteínas marcadoras de EV, como CD63 (Yoshioka et al., 2014).

4.2 Análise fenotípica das Mo-DCs diferenciadas *in vitro* na ausência e presença de EVs

A fim de se testar um efeito modulatório de EVs em células dendríticas diferenciadas saudáveis, adicionou-se, ao início da diferenciação, EVs isoladas de doadores saudáveis ou de pacientes com câncer de mama em monócitos a serem diferenciados. Para isso, ao fim da diferenciação, marcadores de superfície de Mo-DCs foram avaliados por citometria de fluxo. Uma fração das Mo-DCs foi, posteriormente, utilizada para ensaio de proliferação de linfócitos T alógenos para análise da função celular. Na figura 12 está representada a estratégia de análise utilizada para análise do fenótipo das Mo-DCs diferenciadas na presença e ausência de EVs. Primeiramente se delimitou os *singlets* a fim de se eliminar células que passaram no detector do citômetro agrupadas, delimitação da população de característica de células dendríticas através da orientação da granulosidade - *side scatter* (SSC) – e tamanho - *forward scatter* (FSC). A análise foi feita apenas em células vivas (VIVID negativas). Por fim, foi realizada a análise da expressão dos marcadores avaliados (HLA-DR, CD11c, CD80 e CD86), dentro do *gate* DCs vivas.

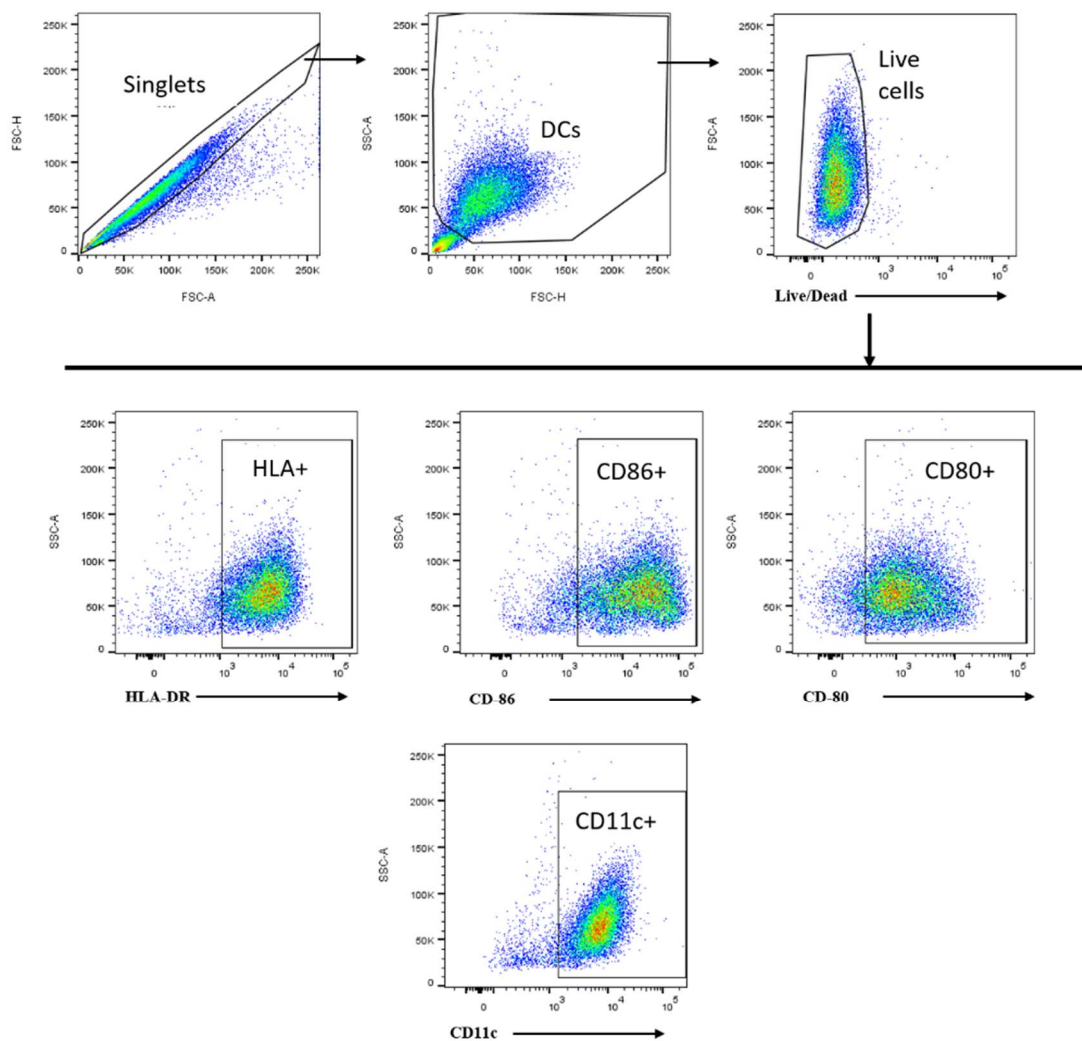


Figura 12 - Imunofenotipagem de Mo-DCs por citometria de fluxo. Dot plots representativos da estratégia de análise utilizada. As Mo-DCs foram diferenciadas na presença e ausência de 30 μ g de vesículas extracelulares. Sequencialmente, foi realizada a delimitação dos *Singlets*, delimitação da população de célula dendrítica por tamanho e granulosidade, análise de viabilidade celular através da positividade para VIVID, e análise da expressão dos diferentes marcadores dentro da população de DCs vivas. A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

Na figura 13 têm-se os valores da intensidade média de fluorescência (MFI), dos marcadores de Mo-DCs diferenciadas na ausência (mDC), presença de EVs de pacientes com câncer de mama (BC) ou EVs de doadoras saudáveis (HD). Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama (BC) possuem uma redução significativa da expressão de HLA-DR quando comparada ao controle (mDC) e as Mo-DCs tratadas com EVs de doadores saudáveis (HD) (Figura 13A) ($p < 0,001$). Observações semelhantes são obtidas quando se verifica a expressão de CD11c (Figura 13B) e das moléculas coestimuladoras de linfócitos CD86 (Fig. 13C) e CD80 (Figura 13D) ($p < 0,01$).

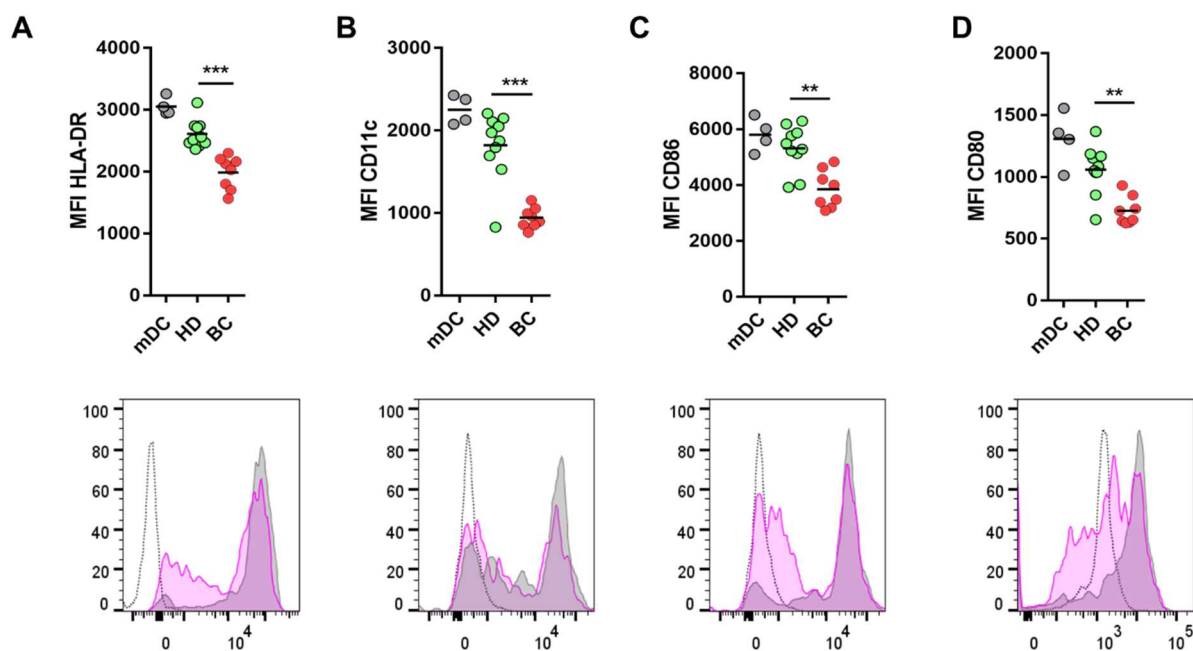


Figura 13 - EVs de pacientes com câncer de mama diminuem a expressão dos marcadores de superfície das Mo-DCs. Os monócitos foram diferenciados em DCs com IL-4 e GM-CSF, na ausência de EVs (mDC), na presença de EVs isoladas de doadores saudáveis (HD, do inglês *healthy donor*) ou de pacientes com câncer de mama ductal invasivo (BC, do inglês *breast cancer*) no dia zero da cultura. A análise por MFI dos marcadores (A) HLA-DR; (B) CD11c; (C) CD86 e (D) CD80 foi realizada no FlowJo. As diferenças foram avaliadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. As figuras A', B', C,' e D', são histogramas representativos de análises dos resultados gráficos de A-D. Linha preta tracejada representa células não marcadas, população rosa representa uma Mo-DC diferenciada com BC EVs, população cinza representa uma Mo-DC diferenciada com HD EVs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada símbolo representa um doador de EVs diferente. Linhas representam a média geométrica. Gráficos representativos de três experimentos independentes realizados com diferentes doadores de monócitos.

As DCs possuem um papel central no início e no controle das respostas, regulando o equilíbrio entre tolerância e imunidade (Domogalla et al., 2017). Embora outras células, como macrófagos e células B, também sejam consideradas células apresentadoras profissionais, as DCs constituem a principal via de ativação das células T *naives* e induzem respostas imunológicas específicas ao antígeno apresentado em todas as células imunes adaptativas (Wilson et al., 2004). Elas podem, por exemplo, captar antígenos não processados e disponibilizá-los para células B específicas e podem induzir sinal de troca de isotipos e envolver as células T (Wykes and MacPherson, 2000). As DCs assumem um papel norteador nas respostas imunes à medida que identificam, traduzem e transmitem a natureza do estímulo antigênico, moldando assim a polarização das células T por diferentes vias de sinalização intracelular (Merad et al., 2013).

A maturação das células dendríticas possui alto grau de plasticidade, sendo responsiva ao conjunto de sinais aos quais é submetida que podem induzir fenótipo inflamatório ou

tolerogênico (Munn et al., 2002). As DCs tolerogênicas, geralmente, exibem um fenótipo imaturo ou semi-maturo que é caracterizado por menor expressão de MHC na superfície, reduzida expressão de moléculas coestimuladoras, como CD80 e CD86, e produção alterada de citocinas favorecendo um fenótipo de produção anti-inflamatório (Steinbrink et al., 2002). Em contraste, a alta expressão de CD80/86 em DCs maduras favorece uma potencialização da ativação de células T efetoras. Em um indivíduo saudável em homeostase, a manutenção da autotolerância é assegurada por uma entrada contínua de DCs de vida curta que fornecem autoantígenos nos órgãos linfáticos secundários (Shortman and Heath, 2001). Este fato indica que a indução de imunidade ou tolerância é altamente dependente do estado mútuo entre o desenvolvimento e ativação das DCs, bem como do microambiente circundante de citocinas e fatores de crescimento (Domogalla et al., 2017).

Já têm sido relatadas numerosas populações de células imunes com funções supressoras no microambiente tumoral, como por exemplo, neutrófilos (Kumar et al., 2017) e células Treg (Bos et al., 2013; Paluskievicz et al., 2019); no entanto, os TAMs M2 e Mreg são os mais extensivamente estudados e bem caracterizados (Lin et al., 2019; Vitale et al., 2019; Zhu et al., 2017). As células dendríticas com fenótipo imaturo ou tolerogênico, como observado neste trabalho na Figura 13, já foram descritas como incapazes de induzir respostas efetoras de linfócitos podendo contribuir para a falha do sistema imunológico no combate a infecções (Campanelli et al., 2006; Montagnoli et al., 2002) ou tumores (Baleeiro et al., 2008; Della Bella et al., 2003; Johnson and Ohashi, 2013).

Várias publicações descreveram alterações fenotípicas e funcionais nas Mo-DCs de pacientes com diferentes tumores (Alvarez et al., 2017; Ramos et al., 2012; Toniolo et al., 2016). O grupo de pesquisa liderado por Barbutto demonstrou que Mo-DCs de pacientes com câncer de mama são estimuladores fracos da proliferação de linfócitos T alógenos, mas são bons indutores de células T reguladoras (Ramos et al., 2012). Essas características foram observadas em Mo-DCs imaturas e maduras e a função regulatória das células T, embora diminuída pelo bloqueio do TGF- β , não foi completamente inibida (Ramos et al., 2012). Fenômenos semelhantes também foram observados em pacientes com LLC, em que as Mo-DC expressaram níveis reduzidos de moléculas importantes envolvidas na apresentação de antígenos e na ativação de linfócitos, como HLA-DR, CD80, CD86, CD83 e CD40. Coerentemente, foram menos eficazes na indução da proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, os linfócitos T CD4⁺ co-cultivados com Mo-DCs de pacientes com LLC apresentaram produção reduzida de IFN- γ e IL-4, quando comparados a doadores saudáveis (Toniolo et al., 2016). Resultados semelhantes também foram observados com Mo-DCs de

pacientes com leucemia mielóide crônica (Brown et al., 2014), câncer colorretal (Orsini et al., 2013) e neoplasia cervical (Lopes et al., 2017).

Também foi observado que Mo-DCs disfuncionais e propensas à apoptose também foram obtidas de doadores saudáveis, quando seus monócitos foram expostos a sobrenadantes da cultura de tumores (Kiertcher et al., 2000). Em estudos realizados por Perrot e colaboradores (2007), o grupo de DCs com expressão baixa de CD11c teve altos níveis da molécula inibitória PD-L1 (ligante de morte programada 1), molécula não analisada neste trabalho nas Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs (Perrot et al., 2007). No trabalho realizado por Liu et al. (Liu et al., 2009) verificou-se que células de tumor de pulmão murino liberam grandes quantidades de prostaglandina E2 e TGF- β , o que resulta na conversão de DCs de ativação imune em DCs tolerogênicas (CD11c^{baixa} CD11b^{alta} Ia^{baixa}). Estas DCs suprimem as respostas das células T que são mediadas, em parte, através da regulação positiva da arginase I, que degrada a arginina, um aminoácido que as células T são incapazes de produzir e que é necessário para a proliferação das células T CD4⁺. A maior expressão de arginase também aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias e consequente bloqueio respostas de células T CD8⁺ e CD4⁺ específicas (Kusmartsev et al., 2004).

Portanto, em conjunto, os resultados descritos na literatura suportam a hipótese da modulação do sistema imune a um estado tolerogênico através alteração do perfil das células dendríticas. Por outro lado, as células dendríticas também são consideradas centrais para indução de uma resposta imune antitumoral eficaz. Assim, DCs com fenótipo imaturo ou tolerogênico, como obtido em Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama, podem não gerar uma resposta imune adaptativa efetiva para o combate ao tumor. Para verificar o perfil das células T ativadas por DCs diferenciadas com EV de pacientes com câncer de mama, realizamos ensaios funcionais incubando as DCs com linfócitos T alógenos, avaliando-se a proliferação de linfócitos, seu estado de ativação e perfil de citocinas secretadas.

4.3 Análise funcional das Mo-DCs diferenciadas *in vitro* na ausência e presença de EVs

A análise da proliferação das subpopulações de linfócitos T estimulados por Mo-DCs geradas foi avaliada através da diluição do CFSE. A estratégia de análise completa está descrita na figura 14. Basicamente, foi realizada a delimitação dos *singlets*, delimitação da análise em linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade, análise apenas em células CD3⁺ vivas e separação das subpopulações de linfócitos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. Todas as células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram marcadas com CFSE no início do experimento. Dentro de cada subpopulação,

foi verificada a proliferação celular através da diluição de células positivas a CFSE. Além disso, a frequência de células T reguladoras (Treg) foi avaliada através da interseção das populações $CD25^+CD127^{low}$ e $CD25^+FoxP3^+$, bem como a avaliação da expressão de marcadores inibitórios e produção de citocinas pelos subtipos celulares ($CD4^+$, $CD8^+$ e Treg).

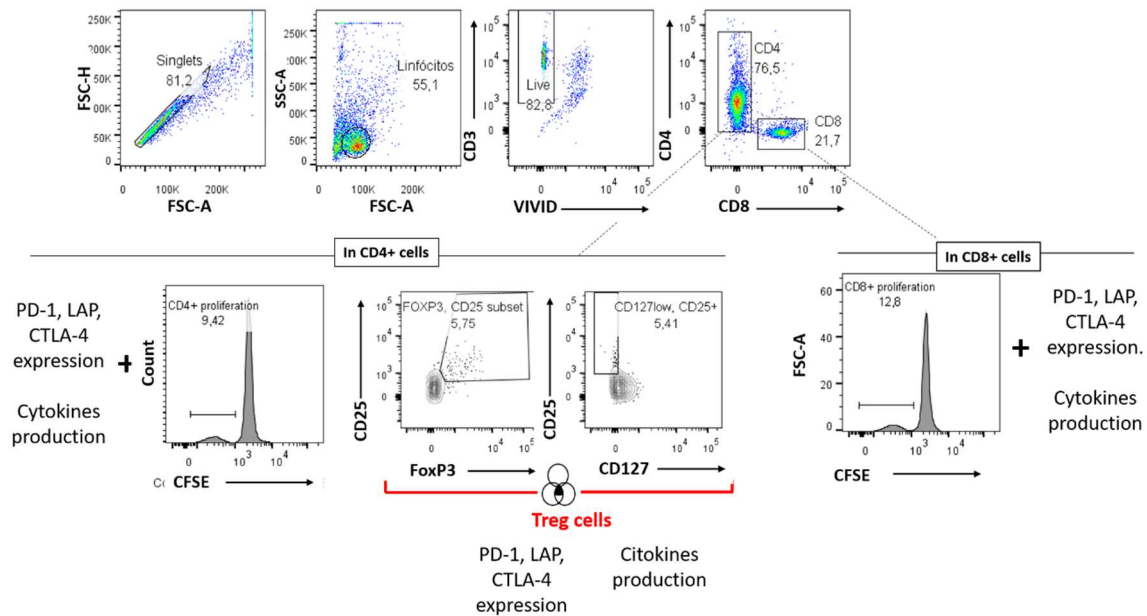


Figura 14 - Análise da proliferação de linfócitos T alógenos em co-cultura com Mo-DCs por citometria de fluxo. *Dot plots* representativos da estratégia de análise utilizada. Sequencialmente, foi realizada a delimitação dos *Singlets*, delimitação da população de linfócitos por tamanho e granulidade, análise de linfócitos vivos ($CD3^+VIVID^-$), distinção de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$. Células T que perderam a fluorescência de CFSE foram consideradas células proliferativas. Para análise de linfócitos T reguladores foi realizada a interseção de *gates* de células $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ & $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

4.3.1 Avaliação da indução de resposta imune adaptativa e fenótipo celular dos linfócitos

Na figura 15 temos a caracterização dos linfócitos em co-cultura com Mo-DCs. Vale ressaltar que não houve diferença na viabilidade celular dos linfócitos analisados entre os grupos experimentais, dados não representados. Primeiramente, na figura 15A, podemos observar que Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama (BC) tiveram uma redução significativa da capacidade de indução da proliferação de células $CD8^+$ e $CD4^+$ e induziram o aumento de células Tregs ($p < 0,001$). Na figura 15B, pode-se observar que as células T $CD8^+$ em co-cultura com Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC tiveram um fenótipo anérgico, caracterizado pelo aumento de células LAP^+ e $PD-1^+$. Em relação às células $CD4^+$, também se observou uma indução de um fenótipo de anergia ou inibitório, devido ao aumento de células $CD4^+LAP^+$ e $CTLA-4^+$, quando co-cultivadas com Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC (Figura 15C). Observamos também um

aumento de frequência de CTLA-4 nas Tregs induzidas por essas Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes (Figura 15D).

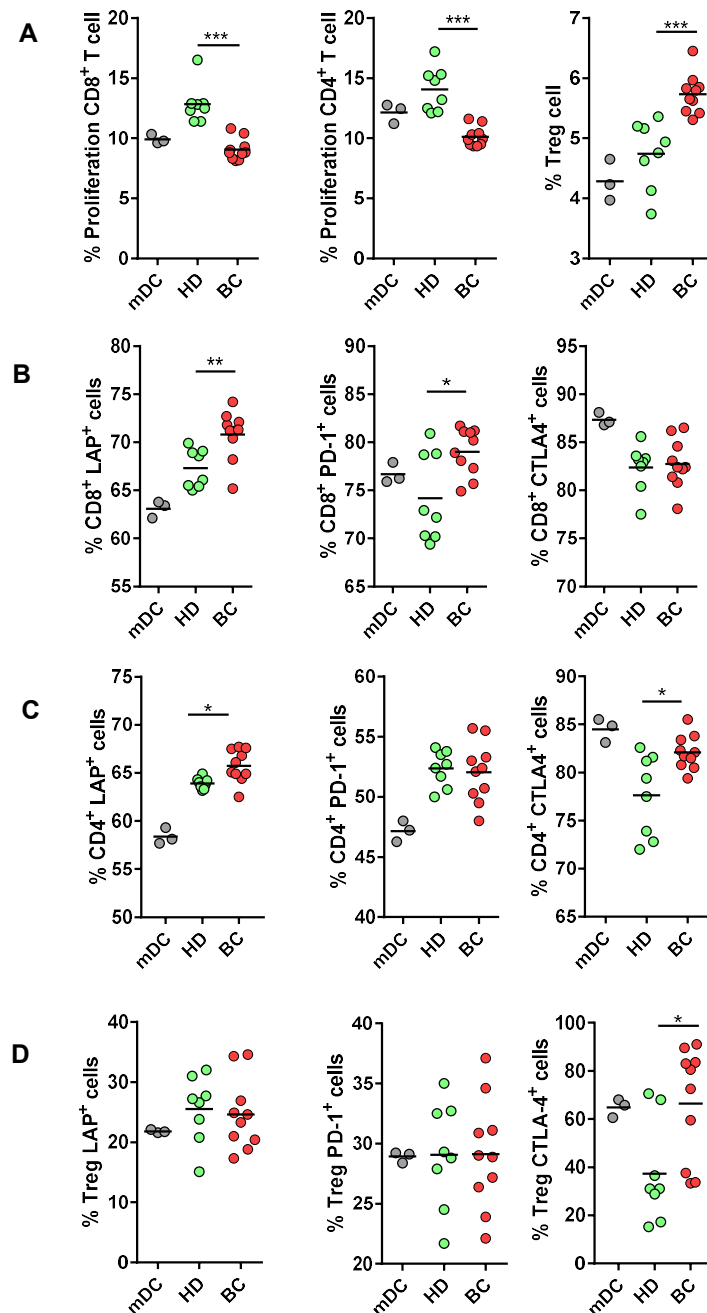


Figura 15 - Caracterização dos linfócitos em co-cultura com Mo-DCs. Os linfócitos alógenos foram cultivados com Mo-DCs diferenciadas na ausência de exossomos (mDC), presença de exossomos de doador saudável (HD) ou presença de exossomos de pacientes com câncer de mama (BC). (A) proliferação de linfócitos CD8⁺, CD4⁺ e indução de Treg, respectivamente; (B) fenótipo de células T CD8; (C) fenótipo de células T e (D) fenótipo de células Treg. Análise ANOVA e para comparação múltipla foi realizado o teste de Tukey, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

A indução de anergia e apoptose de células T periféricas, atenuação das respostas de células T efetoras e de memória e a geração e ativação de subpopulações de células T reguladoras (Treg) foram atribuídas a uma variedade de subtipos de DC tolerogênicas (Boks et al., 2012; Kryczanowsky et al., 2016; Raker et al., 2015). Um fator importante que determina

a progressão do tumor ao longo do tempo é a proporção geral e o caráter das células T dentro do microambiente imune do tumor (Binnewies et al., 2018). É interessante notar que a disfunção das células T no câncer compartilha muitas características com a exaustão das células T que também é observada nas infecções virais crônicas (Pauken and Wherry, 2015). Esta exaustão celular geralmente é caracterizada pelo aumento da expressão de receptores inibitórios (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3 e 2B4) na superfície de células T; perda de funções efetoras, como a produção de citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α ; e perda de capacidade proliferativa (Pauken and Wherry, 2015; Wherry, 2011).

A plasticidade e reversibilidade da exaustão de células T é uma questão importante e aberta nos estudos de imunologia tumoral. No trabalho desenvolvido por Marro e colaboradores, os autores identificaram compostos que restauraram a produção de citocinas e aumentaram a proliferação de células T exauridas, dentre eles o ingenol mebutato, um éster diterpeno indutor da proteína quinase C (PKC) (Marro et al., 2019). Em outros trabalhos, foram identificados estados reversíveis e irreversíveis de exaustão de células T (Philip et al., 2017). Porém, o que se tem observado é que células exaustas irreversíveis não respondem à terapia anti-PD-1/anti-PD-L1 (Pauken et al., 2016).

Prevenir ou reverter a exaustão das células T para controle de tumores a longo prazo será desafiador e, talvez, o direcionamento simultâneo de outras vias de tolerância, como o microambiente inflamatório tumoral imunossupressor, ou através do *priming* de novos clones de células T, possam ser necessários para obter células T antitumorais com resposta duradoura. É provável que a exaustão das células T e o estabelecimento de um infiltrado imunológico tumoral imunossupressor sejam eventos relacionados, de modo que a exaustão ocorra como resultado da combinação de exposição crônica ao antígeno tumoral (Schietinger et al., 2016), interações improdutivas das DCs presentes no microambiente tumoral, exposição a citocinas imunossupressoras (Ruffell et al., 2014) e, agora, como descrito neste trabalho, através de vesículas extracelulares.

Entretanto, até então, embora se soubesse que o sobrenadante de cultura de células de linhagem tumoral (Rommel et al., 2001; Thomachot et al., 2004) pudessem induzir esse fenótipo imunossupressor ou que pacientes com câncer (Brown et al., 2014; Lopes et al., 2017; Orsini et al., 2013) possuíam tendência de diferenciação de DCs tolerogênicas de Tregs e indução de anergia em linfócitos T, é a primeira que se demonstra que tais características são induzidas por vesículas extracelulares circulantes.

4.3.2 Validação dos efeitos observados utilizando monócitos saudáveis de indivíduos diferentes para geração de Mo-DCs

Para verificar se os defeitos funcionais de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama seriam reprodutíveis e independentes do monócito de indivíduo saudável usado para diferenciação, realizamos o tratamento de monócitos saudáveis de outros 2 doadores distintos com as mesmas amostras de EVs. As células dendríticas foram geradas utilizando as citocinas de diferenciação e ativadas com LPS, assim como descrito nos ensaios anteriores (Figura 7). Ao final do ensaio, as Mo-DCs geradas foram usadas para o ensaio funcional de proliferação de linfócitos (Figura 9). Os resultados obtidos estão descritos na figura 16.

Pode-se observar que não houve diferença significativa na viabilidade celular de linfócitos em co-cultura entre os grupos experimentais, identificado pelo número de células mortas em cada condição (Figura 16A). Além disso, foram observados os mesmos efeitos de diminuição da proliferação celular de células $CD8^+$ (Figura 16B) e de células $CD4^+$ (Figura 16C), além do aumento de linfócitos Treg (Figura 16D), por Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes. O aumento de Tregs induzidas pelas Mo-DCs do doador 2 diferenciados com EVs de pacientes com BC não foi significativo, apresentando o valor de p de 0,06. Provavelmente, este efeito foi observado pelo “n” experimental baixo. Porém, esse experimento indicam que os efeitos das EVs de pacientes com BC possam ser independentes da fonte de monócitos para diferenciação de DCs.

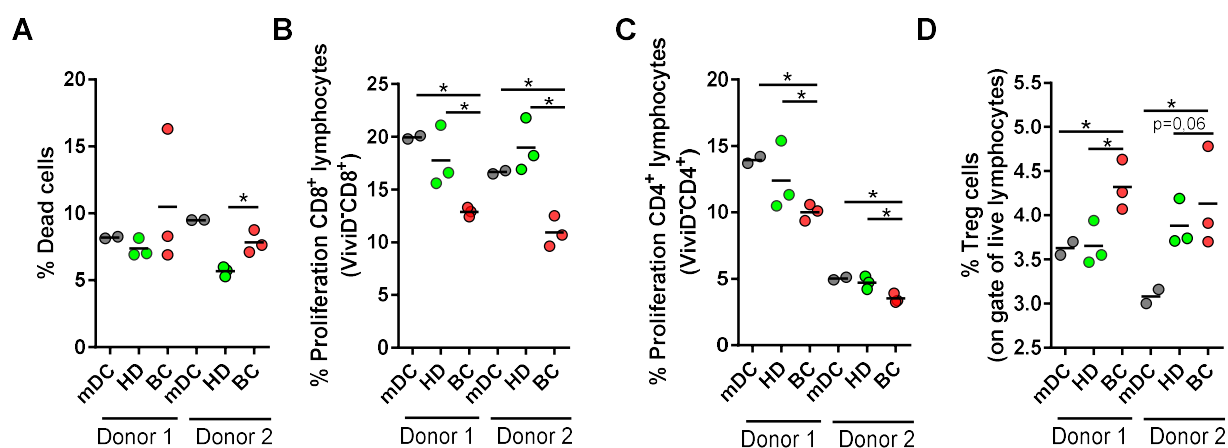


Figura 16 - Análise da reprodutibilidade dos efeitos observados no ensaio funcional gerando Mo-DCs de diferentes monócitos saudáveis. Os monócitos foram tratados com as mesmas EVs de doadores saudáveis distintos (HD), pacientes com câncer de mama distintos (BC) e não tratados com EVs (mDC). (A) Análise de indução de morte celular de linfócitos em co-cultura; (B) Proliferação de linfócitos $CD8^+$; (C) Proliferação de linfócitos $CD4^+$; (D) Frequência de células Tregs induzidas. Gráficos representativos de um experimento.

4.3.3 Identificação de citocinas no ensaio funcional de Mo-DCs

Para melhor caracterizar as células T estimuladas pelas Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs, o perfil de citocinas secretadas por células T foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 17. Pode-se observar que na co-cultura de linfócitos alógenos e Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC há um aumento significativo de produção de IL-10 por células CD8⁺ (Figura 17A), células Treg (Figura 17B) e células CD4⁺ (Figura 17C). Não foi observada diferença na produção de TNF por células T CD8⁺ (dados não representados). Em contrapartida, há uma diminuição significativa de IFN por células CD8⁺ (Figura 17A) e CD4⁺ (Figura 17C), porém, a produção de TNF por células CD4⁺ se manteve inalterada. Por outro lado, observou-se um aumento da citocina IL-2 por linfócitos T CD4⁺ (Figura 17C). A elevada produção de IL-2 por células T CD4⁺ pode sustentar o aumento de Treg observado no ensaio funcional (Figura 15A). A citocina IL-2 é essencial para sobrevivência celular de linfócitos em geral e, também por este motivo, a captação de IL-2 por linfócitos Treg é um dos mecanismos de supressão da resposta imune, indisponibilizando-a para os linfócitos T CD4⁺ efetores e linfócitos citotóxicos (Barthlott et al., 2005; de la Rosa et al., 2004).

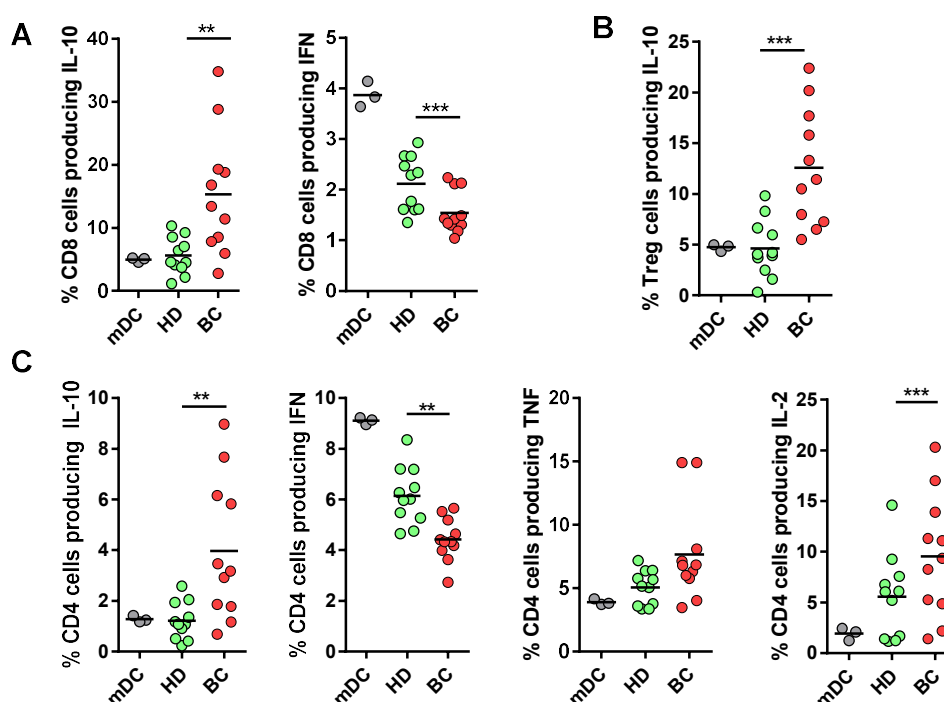


Figura 17 - Produção de citocinas por células T em co-cultura com Mo-DCs. A co-cultura entre linfócitos alógenos e Mo-DCs diferenciada na ausência de EVs (mDC), presença de EVs de doador saudável (HD) ou presença de EVs de pacientes com câncer de mama (BC). A produção de citocinas foi analisada por (A) células T CD8⁺, IL-10 e IFN, respectivamente; (B) células Treg, IL-10; (C) células T CD4⁺, IL-10, IFN e TNF, respectivamente. Análise ANOVA e para comparação múltipla foi realizado o teste de Tukey, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Gráficos representativos de um experimento.

Além do rastreamento das citocinas produzidas por cada subtipo celular específico, foi detectada a produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IFN-gama, IL-10, presentes no sobrenadante da co-cultura, através de ELISA. Os resultados obtidos constam na figura 18 e o resumo dos resultados da produção de citocinas por células no MLR e correlação com as citocinas detectadas no sobrenadante de cultura constam na tabela 4. Pode-se observar na figura 18A uma diminuição da concentração de IFN-gama no sobrenadante de co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com BC. Além disso, observa-se redução significativa de IL-6 (Figura 18B), IL-4 (Figura 18C), IL-12 (Figura 18D) e IL-2 (Figura 18E). Em contrapartida, observou-se um aumento significativo de IL-10 na co-cultura contendo Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC (Figura 18F). Interessantemente, apesar das células T CD4⁺ produzirem significativamente mais IL-2 na co-cultura (Figura 17C), a IL-2 produzida pode ter sido rapidamente captada por células Treg induzidas (Figura 15A), explicando, portanto, uma diminuição geral da IL-2 presente no sobrenadante (Figura 18E) das culturas de MLR com Mo-DCs diferenciadas com EVs de pacientes com BC.

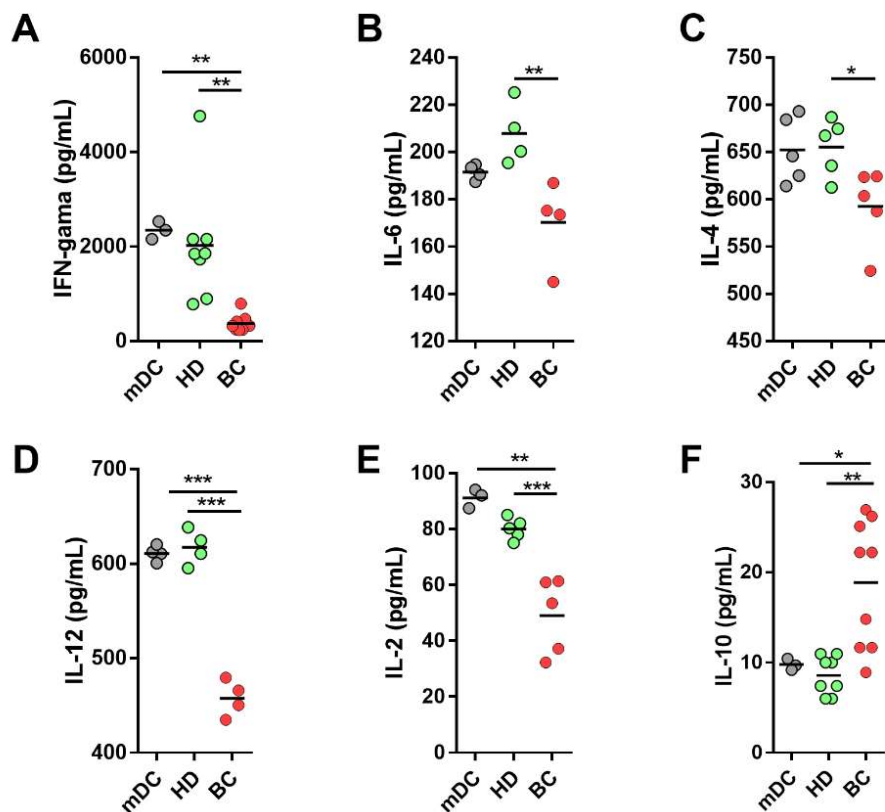


Figura 18 - EVs de pacientes modulam a liberação de citocinas no sobrenadante para um perfil anti-inflamatório na co-cultura. A co-cultura foi realizada com linfócitos T alogênicos e Mo-DC diferenciada na ausência (mDC) e presença de EVs de doadores saudáveis (HD) ou de pacientes com câncer de mama (BC). (A) IFN-gama, (B) IL-6, (C) IL-4, (D) IL-12, (E) IL-2 e (F) IL-10. Cada símbolo representa uma réplica de cultura diferente na qual o sobrenadante foi usado para dosagem de citocinas. Linhas representam as médias geométricas. As diferenças foram avaliadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 4 - Resumo das citocinas produzidas por células T CD4, CD8 e reguladoras no MLR e correlação com as detectadas no sobrenadante de cultura.

MLR de DCs diferenciadas na presença de BC EVs com Linfócitos T					
Citocina	CD4	CD8	Treg	Sobrenadante	Possível implicação
IL-2	Aumentada	-	-	Diminuída	Captação de IL-2 por Treg aumentada
IL-10	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Indução de fenótipo imunossupressor
IFN-gama	Diminuída	Diminuída	-	Diminuída	Perfil inflamatório não estimulado
TNF	Sem alteração	Sem alteração	-	-	
IL-6	-	-	-	Diminuída	Perfil inflamatório não estimulado
IL-4	-	-	-	Diminuída	Perfil inflamatório não estimulado
IL-12	-	-	-	Diminuída	Menor estímulo de fenótipo inflamatório das DCs

Treg: células T reguladoras, MLR: do inglês *mixed lymphocyte reaction* (reação mista de linfócitos), DCs: células dendríticas. Aumentada: níveis aumentados detectados. Diminuída: níveis diminuídos detectados. BC: do inglês *breast cancer* (câncer de mama), EVs: do inglês *extracellular vesicles* (vesículas extracelulares). Em azul, células com capacidade diminuída de proliferação no ensaio. Em vermelho, células estimuladas e em grande atividade.

Muitas citocinas funcionam para recrutar tipos celulares específicos para um microambiente inflamatório e podem afetar o potencial metastático, a progressão do tumor e a angiogênese. As citocinas variam entre os diferentes estágios do câncer de mama (estágio inicial versus metastático) (Conlon et al., 2019). As citocinas podem aumentar ou inibir a resposta imune do hospedeiro (Conlon et al., 2019) e muitas citocinas são pleiotrópicas com efeitos positivos na progressão tumoral e atividade antitumoral, no câncer de mama, como demonstrado na Tabela 5. Em geral, as respostas antitumorais diminuídas são devidas (1) à liberação de citocinas do perfil do tipo 2 ou imunossupressoras (por exemplo, IL-4, IL10, IL-13, IL-33, IL-35, IL-37 e TGF- β), (2) o recrutamento de células com efeitos imunossupressores como Tregs, células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs) ou (3) a falta de

recrutamento de células com efeitos imunomoduladores como células T CD8⁺, células NK e DCs (Gatti-Mays et al., 2019).

Tabela 5 - Efeitos de citocinas no microambiente do câncer de mama

Citocina	Fonte	Efeito no tumor	Agentes clínicos em desenvolvimento para uso no cancer de mama
IL-1	Células B DCs maduras Células NK Macrófagos	Pró-Tumor • Promove invasão tumoral • Promove inflamação	Antagonista do receptor de IL-1 • Anakinra (NCT01802970) • IL-1 mAB neutralizante • Canakinumab (NCT03742349)
IL-2	Células T ativadas Células NK DCs Macrófagos	Antitumor • Ativação de células NK • Ativação de células CD8 ⁺	Análogo de IL-2 • Aldesleukin (NCT00006228) • Bempedalesleukin (NCT02983045; NCT03435640)
IL-6	Células B TAMs Células tumorais	Pró-Tumor • Resistência ao tratamento • Aumento da plasticidade tumoral • Promoção da metástase	Antagonista de IL-6 • Tocilizumab (NCT03135171)
IL-10	TAMs Células B	Antitumor (pleiotrópico) • Pró-Tumor • Promove Tregs • Inibe células T efectoras • Promove fenótipo tolerogênico em macrófagos e células dendríticas	Antagonista de IL-10 • Pegilodecakin (NCT02009449)
IFN- gamma	DCs Células NK Macrófagos Células B Células T Câncer de mama	Antitumor • Melhora a apresentação antigênica • Aumenta atividade CTL	Análogo de IFN • Human-leukocyte IFN (NCT03328026) Agentes estimulantes do IFN • MIW815 (NCT02675439)

Linfócito T citotóxico CTL, célula dendrítica DC, interferon IFN, interleucina IL, anticorpo monoclonal mAB, células supressoras derivadas de mielóides MDSC, assassina natural NK, macrófagos associados ao tumor TAM. Fonte: adaptado de Margaret et. al., 2019.

A plasticidade do tumor é impulsionada por várias citocinas incluindo IL-6, IL-8 e TGF- β , estando estas associadas à progressão do tumor, metástase, resistência à terapia e/ou maus resultados clínicos (Dominguez et al., 2017; Esquivel-Velazquez et al., 2015; Jones and Jenkins, 2018). Além da produção dessas citocinas por células efectoras (células T, células B, células NK), elas também são produzidas por células tumorais e macrófagos associados a tumores (TAMs). Especificamente em câncer de mama, altos níveis circulantes de IL-6 estão associados à doença avançada, maior risco de recorrência e fenótipos agressivos (Heo et al., 2016). Em estudos pré-clínicos demonstraram que a secreção tumoral de IL-6 está relacionada à resistência ao tratamento, incluindo resistência ao tamoxifeno em linhagens celulares de

câncer de mama luminal e resistência ao trastuzumabe em linhas celulares de câncer de mama com superexpressão de HER2. A administração de tocilizumab, um antagonista da IL-6, reduziu a população de células-tronco tumorais nos xenoinxertos de camundongos e reduziu o crescimento e as metástases de tumores (Heo et al., 2016). Existem dados clínicos limitados sobre o bloqueio da IL-6 no câncer de mama, com apenas um estudo em andamento usando tocilizumabe em combinação com trastuzumabe e pertuzumabe em pacientes com câncer de mama metastático HER2⁺ resistente a trastuzumabe (NCT03135171) (Heo et al., 2016; Jones and Jenkins, 2018).

A IL-2 melhora a função das células NK e das células T CD8⁺ (Dranoff, 2004). A IL-2 recombinante (aldesleucina) é uma terapia aprovada pela FDA para melanoma metastático e carcinoma de células renais. Os resultados de um estudo piloto de fase I em câncer de mama metastático HER2⁺ indicaram que a IL-2 combinada com trastuzumabe foi bem tolerada e proporcionou benefício clínico (Repka et al., 2003). No entanto, nenhuma resposta foi observada no estudo de fase II subsequente para pacientes que progrediram no trastuzumabe (Mani et al., 2009). Estudos pré-clínicos com IL-2 conjugada com 6 cadeias liberáveis de polietilenoglicol (NKTR-214) demonstrou atividade antitumoral satisfatória e perfil de ativação imune em relação à aldesleucina (Charych et al., 2016). Um estudo de fase I examinando o NKTR-214 como um agente único em tumores sólidos metastáticos mostrou evidência de atividade antitumoral e um perfil de segurança favorável (Bernatchez et al., 2017). Esse agente agora está sendo examinado em combinação com vários agentes imunooncológicos (incluindo nivolumabe) no TNBC (NCT02983045; PIVOT).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica que exhibe propriedades promotoras de tumor e inibidoras. A IL-10 é expressa em pacientes com câncer de mama e tem sido associada a um mau prognóstico (Cecil et al., 2014; Kawaguchi et al., 2019). Um estudo pré-clínico recente que combina IL-10 humana conjugada com polietilenoglicol (AM0010 ou pegilodecakin) com docetaxel em modelos de tumor de mama murino 4T1 (TNBC) demonstrou sinergia, com dados obtidos em estudos *in vivo* utilizando camundongos (Ratti et al., 2018). No entanto, dado seu papel paradoxal no desenvolvimento de tumores e incerteza sobre a melhor forma de modulação para induzir uma resposta antitumoral (em vez da promoção do tumor), poucos agentes direcionadores de IL-10 estão em desenvolvimento clínico. Um estudo avaliou a IL-10 humana conjugada a polietilenoglicol (AM0010) em pacientes com tumores sólidos refratários a tratamentos prévios ($n = 51$) e mostrou um perfil de toxicidade aceitável com evidência de ativação imune evidenciada pelo aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias

no soro como IFN-gama e IL-18 e redução de TGF- β . Mesmo tratando-se de pacientes refratários a tratamento quimioterápico ou imunoterápico (com anti-PD-L1), observou-se atividade antitumoral (taxa de resposta geral de 27%), através da observação da redução do tumor e diminuição de focos de metástases confirmadas por histologia. Para comparação, foi realizado um estudo pareado entre os pacientes antes ou após tratamento (Naing et al., 2016).

Os ensaios clínicos com IFNs do tipo I e II em malignidades sólidas tiveram sucesso variável e estão associados a toxicidades moderadas a graves. Os tumores humanos não inflamados não possuem IFNs do tipo I, que são importantes na erradicação do tumor mediada por imunidade inata e adaptativa (Fuertes et al., 2011). O IFN- α e o IFN- β melhoram a apresentação do antígeno tumoral e aumentam a morte citotóxica das células tumorais (Dranoff, 2004). Apesar de uma promissora taxa de resposta de 20 a 40% em estudos piloto com IFN de leucócitos humanos (uma mistura de subtipos de IFN- α), os estudos subsequentes em monoterapia em pacientes com câncer de mama avançado não tiveram sucesso (Parker et al., 2016). Há um ensaio clínico em andamento usando o IFN- α em associação ao anticorpo monoclonal anti-PD-1 (pembrolizumabe) contra o câncer de mama metastático (NCT03328026). A terapia combinada com doses baixas de IFN- β , IL-2 e tamoxifeno foi bem tolerada, teve efeitos imunoestimuladores, uma taxa de resposta de 46% e um benefício de sobrevivência no câncer de mama avançado (Nicolini et al., 2007).

Além disso, Ruffel et al. mostraram que, durante o câncer de mama, a expressão da citocina IL-12, especificamente por células dendríticas humanas, esta associado ao aumento da resposta à quimioterapia (Ruffell et al., 2014).

Portanto, o fenótipo de citocinas quantificadas no sobrenadante de cultura e produzidas por linfócitos T em co-cultura com Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer, de forma geral, são marcadas por um fenótipo imunossupressor. Esse fenótipo imunossupressor, ratifica a menor capacidade de indução de linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e estímulo de linfócitos Tregs, além da caracterização do estado celular anérgico de linfócitos (Figura 15).

4.4 Análise da alteração das vias de maturação das Mo-DCs diferenciadas *in vitro* na presença de EVs

Após a descrição de indução de DCs tolerogênicas por EVs de pacientes com câncer de mama, foi realizada a análise de possíveis vias de sinalização que poderiam estar envolvidas

para desencadear este fenótipo celular. Dentre as vias de sinalização ativadas após indução de maturação de DCs estão: NF- κ B e mTOR (Figura 6).

A via do fator nuclear (NF)- κ B é crucial para a maturação das DC por estímulos inflamatórios *in vivo* ou *in vitro*. Entre os fatores de transcrição, a forma heterodimérica ativa p50/p65 do fator nuclear desempenha um papel central nos processos imunológicos, induzindo a expressão de uma variedade de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (Baldwin, 1996). Em macrófagos, o NF- κ B pode ser ativado pela exposição ao LPS, bem como por citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) e infecções virais (Beg and Baltimore, 1996; Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996). DCs maduras expressam altos níveis da família de fatores de transcrição NF- κ B (Granelli-Piperno et al., 1995) e a sinalização por membros da família de receptores TNF- α , como CD40 e RANK, resulta na ativação de NF- κ B (Banchereau and Steinman, 1998). Os diferentes membros desta família podem formar uma variedade de homo e heterodímeros e podem regular a expressão de CD80, CD86, citocinas e MHC classe II, por exemplo, durante a maturação de DCs (Hernandez et al., 2007; Martin et al., 2003).

Outra via muito importante na maturação de DCs é a via do mTOR. Após a ativação mediada por receptores de reconhecimento padrão, as DCs começam a mudar sua morfologia e rapidamente produzem citocinas precoces, como TNF- α ou óxido nítrico (NO) (Pearce and Everts, 2015). Logo em seguida, as DCs migram para os órgãos linfóides secundários para estimular linfócitos T, induzindo uma resposta adaptativa. A alteração de uma célula endocítica para uma célula ativada anabólica que secreta diferentes moduladores imunológicos e estimula células T, requer uma mudança drástica nos requisitos metabólicos e biossintéticos (Pearce and Everts, 2015). Dessa forma, as DCs precisam detectar os nutrientes disponíveis para coordenar e adaptar o metabolismo energético e a produção das moléculas de citocinas. Neste sentido, o principal mecanismo celular regulador desta adaptação é a rede mTOR (Jewell et al., 2013; Laplante and Sabatini, 2012; Pearce and Everts, 2015; Weichhart et al., 2015). Portanto, a rede mTOR, através dos sinais extra e intracelulares controlam uma ampla variedade de processos celulares básicos, como metabolismo e síntese de proteínas, que ditam e modelam subsequentemente respostas imunes inflamatórias das DCs, inclusive indução de estado tolerogênico (Sukhbaatar et al., 2016).

A capacidade do sistema imunológico do hospedeiro de reconhecer e responder aos componentes microbianos é amplamente mediada pelo sistema imunológico inato através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), dentre eles, da expressão de uma família de receptores transmembranares do tipo I, receptores do tipo Toll (TLRs) (Medzhitov et al., 1997). A ativação de TLRs por produtos microbianos leva ao envolvimento de um número

diversificado de vias de sinalização intracelular que ditam aspectos qualitativos e quantitativos da resposta inflamatória do hospedeiro (Kumar et al., 2009). Para verificar se essas vias estavam alteradas em DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com BC, ativamos as Mo-DCs com LPS e após 5 e 30 minutos os complexos de mTOR e NF- κ B foram avaliados. O resultado da análise dos complexos de NF- κ B e mTOR estão na figura 19.

Para representar a via de sinalização de NF- κ B avaliamos o nível de NF κ B1 (p50) após 5 e 30 minutos de ativação da maturação das DCs com LPS. Pode-se observar um aumento dos níveis de NF κ B1 (p50), entre 5 e 30 minutos, em ambos os grupos de Mo-DCs diferenciadas da presença de HD ou BC EVs, sendo, portanto, significativamente semelhantes. Além disso, também avaliamos a ativação da via de mTOR através da detecção do complexo mTOR fosforilado (pmTORC). Interessantemente, Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC, após 30 minutos de ativação com LPS, não observamos o aumento da ativação do complexo de mTOR, como é observado no grupo Mo-DCs diferenciadas da presença de HD EVs. Em adição, observou-se uma menor fosforilação da proteína P70-S6 kinase, proteína que está a jusante de mTORC, em Mo-DCs diferenciadas com BC EVs (Fig 19). A proteína glicogênio sintase 3 (GSK-3) em sua forma inibida (fosforilada na Ser-9) também foi avaliada por ser uma proteína central no processo de adaptação metabólica e maturação de DCs, além de possuir interação com via de mTOR (Fig. 6). Observou-se um fenótipo totalmente inverso no padrão de GSK-3 β -Ser9 entre Mo-DCs diferenciadas na presença de HD ou BC EVs (Fig. 19). Foi identificada uma diminuição da fosforilação da ser-9 da GSK-3 em Mo-DCs do grupo BC, enquanto em Mo-DCs do grupo HD, teve-se com um forte aumento diante o estímulo com LPS.

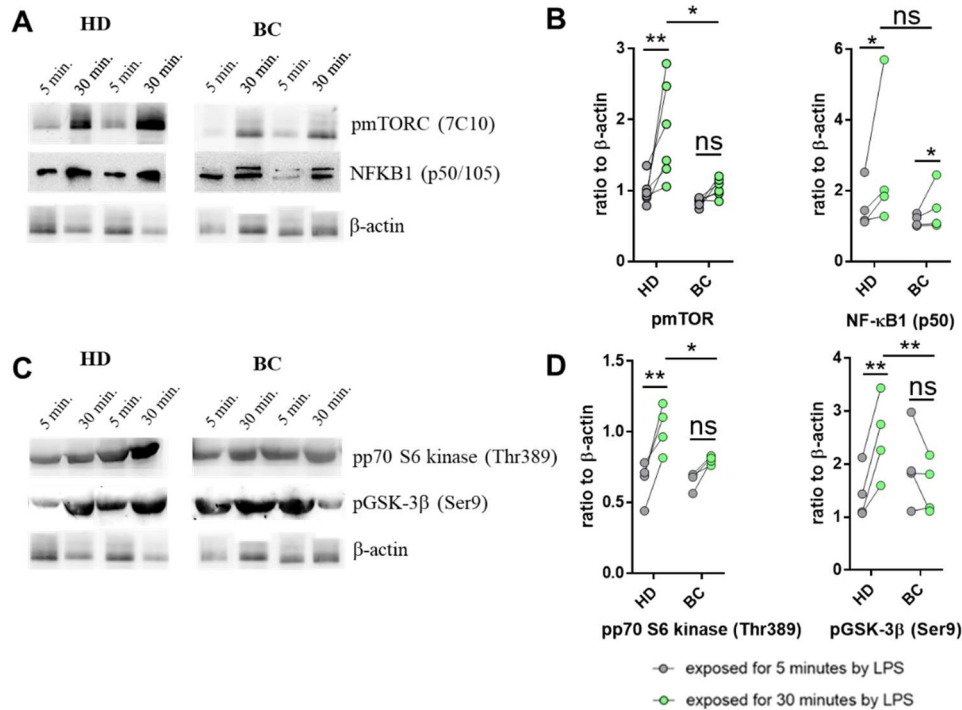


Figura 19 - Análise da sinalização NF- κ B e mTOR por Western Blotting. Análise da via de sinalização de pmTOR e NFKB1 em Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de doadores saudáveis (HD) ou pacientes com câncer de mama (BC). (A) Imunoblots representativos de lisados de DC humana expostos à ativação de LPS por 5 e 30 min e (B) gráficos quantitativos de pmTORC, NF- κ B, pp70S6 quinase e pGSK-3 β . Os gráficos de linhas representam a razão entre a intensidade da banda alvo dividida pela intensidade da β -actina expostas a LPS. Círculos cinza: DCs expostas por 5 minutos a LPS; círculos verdes: DCs expostas por 30 minutos a LPS; As diferenças foram avaliadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey *, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$.

A proteína GSK3 foi originalmente isolada e caracterizada a partir do músculo esquelético há 40 anos atrás (Embi et al., 1980; Rylatt et al., 1980). Desde a sua caracterização inicial como uma enzima crítica envolvida na biossíntese de glicogênio, a GSK3 demonstrou ser um ponto de convergência para inúmeras vias de sinalização celular envolvidas em uma infinidade de processos fisiológicos. A GSK3 regula o desenvolvimento embrionário, o controle do ciclo celular, a diferenciação celular, motilidade celular, função de microtúbulos, apoptose, adesão celular e inflamação (Doble and Woodgett, 2003; Jope and Johnson, 2004; Jope and Roh, 2006; Jope et al., 2007; Kockeritz et al., 2006). Demonstrou-se que o número incrível de processos celulares que são controlados direta ou indiretamente pelo GSK3 deve-se, em grande parte, à sua capacidade de modificar os fatores de transcrição pós-traducionais por sua capacidade de fosforilar resíduos de serina ou treonina específicos de locais de consenso (Ali et al., 2001; Hu et al., 2006; Jope and Johnson, 2004; Jope et al., 2007; Patel and Woodgett, 2008) (Figura Suplementar 1). Devido à capacidade do GSK3 de impactar inúmeras vias de sinalização intracelular, não surpreende que a desregulação do GSK3 tenha se mostrado

envolvida no início ou na progressão de muitas doenças, incluindo o câncer (Patel and Woodgett, 2008).

Nos mamíferos, a GSK3 existe como duas isoformas principais, GSK3- α e GSK3- β , e são codificadas por genes distintos. O gene que codifica GSK3- α expressa um polipeptídeo maduro de 51 kD, enquanto o gene que codifica GSK3- β expressa um polipeptídeo maduro de 47 kD. As diferenças de peso molecular entre GSK3- α e GSK3- β são o resultado de uma extensão rica em glicina no terminal N da GSK3- α (Woodgett, 1990). A GSK-3 é regulada negativamente pela fosforilação de uma serina N-terminal (Ser-21 para GSK-3 α e Ser-9 para GSK-3 β) (Hughes et al., 1993; Takahashi-Yanaga et al., 2004; Wray et al., 2011). Molecularmente, a fosforilação da serina-21 na GSK-3 α ou da serina-9 na GSK-3 β faz com que a cauda N-terminal da GSK-3 atue como um substrato pré-fosforilado ou pseudosubstrato. Essa cauda de serina fosforilada se auto-associa na bolsa de ligação do substrato, dificultando a ligação do mesmo, impedindo-o de ser fosforilado (Frame et al., 2001). Até o momento, a fosforilação de GSK3- α ou GSK3- β foi o único mecanismo relatado para afetar a atividade de GSK3 em células imunes (Hu et al., 2006).

Os papéis da GSK3 na maturação, sobrevivência e produção de citocinas de células dendríticas (DC) também foram estudados. Trabalho realizado por Rodionova e colaboradores, por exemplo, demonstrou que o estado ativado da GSK-3 (baixa fosforilação da Ser9 e alta fosforilação da Tyr216) inibiu o processo de maturação de DC imaturas e suprimiu a diferenciação de monócitos humanos mediada por IL-4 / GM-CSF em DC. A análise por citometria de fluxo dessas células mostrou que a inibição de GSK-3 resultou em um fenótipo semelhante a macrófagos e que os monócitos inibidos por GSK-3, mesmo na presença de citocinas IL-4 e GM-CSF e ativação, não expressavam CD83 e exibiam baixos níveis de CD80 e CD86. Inibição de GSK3 em DC estimulada com CD40L ou *Escherichia coli* suprimiu sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias (Rodionova et al., 2007). Esses resultados são concordantes com os realizados por Alessandrini e colaboradores, que observou que quando GSK-3 β é fosforilada na serina 9 ela se torna inibida e a maturação de Mo-DCs ocorre (Alessandrini et al., 2011). Ono e colaboradores também relataram que a baixa fosforilação de GSK3-Ser9 prejudicou a capacidade das DC diferenciadas de induzir respostas pró-inflamatórias, e que essas células com inibição de GSK-3 não tinham capacidade de produzir IL-6 em resposta à estimulação de CD40L (Ono et al., 2007). No trabalho realizado por Martin e colaboradores, a presença de baixos níveis de GSK-3 β - Ser-21/9 resulta na secreção elevada de IL-10 e concomitante diminuição da secreção de IL-12p40, IL-6 e TNF- α de monócitos humanos (Martin et al., 2005b; Rodionova et al., 2007; Wang et al., 2011). Esses dados

corroboram com os encontrados no presente trabalho pois observamos que em Mo-DCs diferenciadas com BC EVs, observamos uma diminuição de GSK-3 β -Ser9 associada com um fenótipo tolerogênico das DCs com alta baixos níveis de IFN-gama, IL-2, IL-12, IL-6 e altos níveis de IL-10 em MLR. Esse potencial de regulação de citocinas por GSK-3 β pode ser explicado pela capacidade dessa proteína afetar positiva e negativamente uma variedade de fatores de transcrição que são críticos na regulação da síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias (Figura suplementar 2) (Demarchi et al., 2003; Ono et al., 2007; Wang et al., 2011).

Em relação ao fenótipo de DCs, no trabalho realizado por Qian e colaboradores (2013), os autores mostraram que células DCs que possuíam expressão alta de CD11b e baixa de IA/IE (MHC de classe 2) expressavam alto nível de Fas. Esse aumento da expressão de Fas nas DCs era promovido por TGF- β derivado de células estromais endoteliais via ativação de ERK. Neste trabalho, foi verificada que a ligação as DCs tolerogênicas inibiam a proliferação de células CD4⁺. Além disso, a ligação Fas induziu preferencialmente DCs tolerogênicas a produzirem IL-10 e IP-10 via inativação de GSK-3 mediada por ERK e subsequente regulação positiva de β -catenina. Curiosamente, as células T ativadas podiam induzir DCs tolerogênicas para secretar mais IL-10 e IP-10 parcialmente através do FasL (Qian et al., 2013).

Portanto, em conjunto, esses trabalhos sugerem a GSK3 como um importante ponto de modulação de vias de sinalização, incluindo em células dendríticas, a fim de induzir um estado inflamatório ou tolerogênico, regulando a maturação celular e produção de citocinas.

Apesar de se tratar de apenas uma proteína quinase, a proteína GSK refere-se a dois paralelos que são comumente referidos como isoformas, GSK3 α e GSK3 β . A descrição do mecanismo molecular desencadeado a partir de uma ativação de um estímulo é complexo e um grande desafio. Uma análise teórica constatou que a GSK-3 β possui mais substratos previstos do que qualquer outra quinase assumindo valores superiores a 500 substratos, enquanto que a média de substratos para outras 68 quinases foi de 12 (Linding et al., 2007). Embora o valor predito seja maior ainda, já foram relatadas cerca de 100 proteínas fosforiladas pelo GSK3 (Sutherland, 2011). Assim, uma chave para as ações da GSK3 pode ser os múltiplos mecanismos regulatórios disponíveis para orquestrar suas ações específicas do substrato a fim de incorporar novas vias de sinalização sem perturbar as que já existem (Beurel et al., 2015).

Diferentes vias de sinalização fornecem quinases que medeiam a fosforilação da Ser-9 ou -21 de GSK3, dentre elas a Akt, proteína quinase A (PKA), proteína quinase C, quinase p70 S6, dentre outras. Assim, distintas vias de sinalização que ativam essas quinases podem inibir a GSK3 fosforilando as serinas inibidoras na GSK3 (Beurel et al., 2015). A quinase p70 S6

(p70S6K) também foi avaliada neste trabalho (Figura 19 C e 19D). Em consonância com a diminuição dos níveis de GSK-3 β -Ser-9, os níveis de p70S6K nas Mo-DCs diferenciadas na presença de BC EVs foi significativamente menor quando comparadas às Mo-DCs diferenciadas com HD EVs.

Em resumo, neste trabalho, o efeito observado da diminuição da fosforilação da Ser9 da GSK-3 β , p70S6K e pmTORC (ambos *downstream* de GSK-3) em Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama, mesmo após ativação de TLR por LPS. Esta observação pode justificar o efeito fenotípico gerado das DCs, incapacidade de geração de resposta imune adaptativa via CD4⁺ e CD8⁺, além da estimulação de células Treg, devido ao papel funcional de GSK no processo de maturação e ativação de DCs. Além disso, o perfil de citocinas do MLR com Mo-DCs diferenciadas com BS EVs teve baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias e aumento de IL-10, o que também sugere ser em resposta a uma menor presença de GSK-3 β (Ser-9) nas DCs geradas ou um efeito combinado com outros fatores ainda não determinados. Para uma melhor identificação dos mecanismos moleculares envolvidos no processo, o presente trabalho começou a ser direcionado para o entendimento de possíveis moléculas que poderiam estar envolvidas na regulação da fosforilação de GSK-3 β .

4.5 Análise de miRNAs presentes em EVs de pacientes com câncer de mama capazes de modular componentes celulares em Mo-DCs

Dentre as diferentes moléculas que podem ser carregadas em EVs, temos os miRNAs. Essas moléculas já vêm sendo descritas como importantes moduladoras do microambiente tumoral em diferentes tumores, incluindo câncer de mama (Baroni et al., 2016; Rupaimoole et al., 2016; Tang et al., 2016; Yang et al., 2018a). Diferentes mecanismos, como amplificação de DNA, deleção e mutações relacionadas a locais de miRNA, silenciamento epigenético ou inibição de processamento específico de miRNA, podem levar à expressão alterada de miRNA em diferentes tipos de câncer (Alajez et al., 2011). Além disso, os miRNAs circulantes livres de células geralmente podem existir ligados a complexos de ribonucleoproteínas ou lipoproteína de alta densidade ou, ainda, em vesículas extracelulares. Neste contexto, também podem ser utilizados como biomarcadores associados ao tumor (Valadi et al., 2007; Vickers et al., 2011).

Portanto, para avaliar possíveis miRNAs presentes nas vesículas extracelulares foi realizada uma busca na literatura de miRNAs superexpressos no sangue periférico ou plasma

de pacientes com câncer de mama. Após isso, foi realizado o refinamento da busca utilizando o TargetScan (Agarwal et al., 2015) e miRDB (Wong and Wang, 2015), a fim de verificar os miRNAs que possuíam como alvo moléculas que observamos redução da expressão na análise fenotípica das Mo-DCs geradas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama, bem como proteínas do complexo de mTOR e GSK3. Os miRNAs validados com superexpressão no plasma de pacientes com câncer de mama estão descritos na Tabela 6 e a representação esquemática do delineamento de refinamento está descrita na figura 20, que também descreve os miRNAs selecionados para detecção nas EVs. A regulação de PTEN foi utilizada como critério de inclusão pois se encontra *upstream* de GSK-3 e regula negativamente a atividade da Akt pela desfosforilação PIP3 que Akt requer para a localização da membrana (Figura 6).

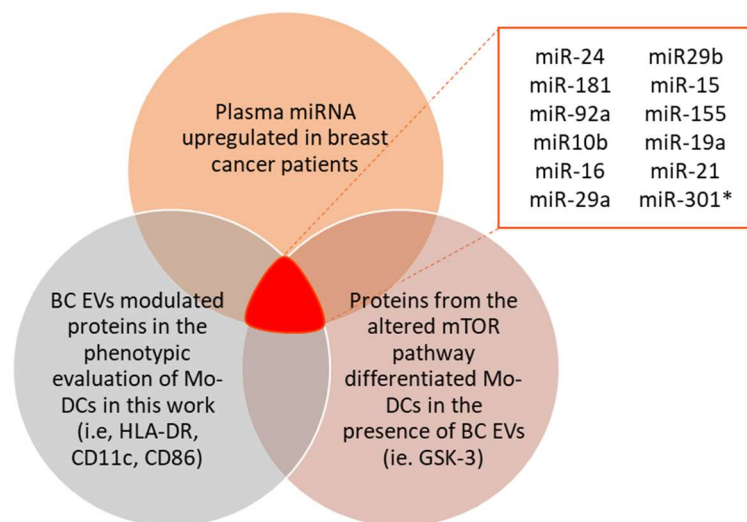


Figura 20 - Estratégia utilizada para delimitação de miRNAs a serem detectados em vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama e indivíduos saudáveis. Doze miRNAs foram refinados para análise em EVs. *A presença de miR-301 não foi detectada em HD EVs e BC EVs.

Tabela 6 - Busca na literatura de miRNAs validados como superexpressos no plasma ou sangue de pacientes com câncer de mama

miRNA	Alvo relacionado ao presente trabalho	Referência
miR-106	Não determinado	(Wang et al., 2010)
mir-10b	PTEN	(Mangolini et al., 2015)
miR-1246	Não determinado	(Shimomura et al., 2016)
miR-127	Não determinado	(Alunni-Fabbroni et al., 2018)
miR-127-3p	Não determinado	(Cuk et al., 2013)
miR-133a	Não determinado	(Shen et al., 2014)
miR-148b	Não determinado	(Cuk et al., 2013; Shen et al., 2014)
mir-155	GSK3	(Sochor et al., 2014; Wang et al., 2010)
miR-15a	Não determinado	(Kodahl et al., 2014)
miR-15b / 16	GSK3, CD11c, CD80	(Singh et al., 2015)
miR-181b	GSK3, GSKIP	(de Couto et al., 2017; McClure et al., 2014; Sochor et al., 2014)
miR-195	Não determinado	(Heneghan et al., 2010)
miR-19a	PTEN	(Alunni-Fabbroni et al., 2018; Sochor et al., 2014)
mir-21	Não determinado	(Matamala et al., 2015; Wang et al., 2010)
miR-22	Não determinado	(Alunni-Fabbroni et al., 2018)
miR-24	CD80 e GSK3	(Sochor et al., 2014)
miR-24	GSK3	(Singh et al., 2015; Sochor et al., 2014)
miR-29a	GSK3	(Singh et al., 2015)
miR-301	PTEN	(Shi et al., 2011)
miR-376a	Não determinado	(Cuk et al., 2013)
miR-409a	Não determinado	(Cuk et al., 2013)
miR-484	Não determinado	(Zearo et al., 2014)
miR-652	Não determinado	(Cuk et al., 2013)
miR-801	Não determinado	(Cuk et al., 2013)
miR-92a	GSK3	(Chan et al., 2013; Yu et al., 2018)

O resultado das quantificações dos miRNAs analisados em EVs de pacientes com câncer de mama em relação a EVs de doadores saudáveis pode ser observado na figura 21. Os miRNAs miR-301 e miR-10b não foram detectados em nenhum dos grupos e, portanto, não estão representados na figura. Pôde-se observar um enriquecimento significativo dos miRNAs

miR-24 ($p < 0,05$), miR-21 ($p < 0,05$), miR-92a ($p < 0,05$) e, principalmente, do miR-181b ($p < 0,001$).

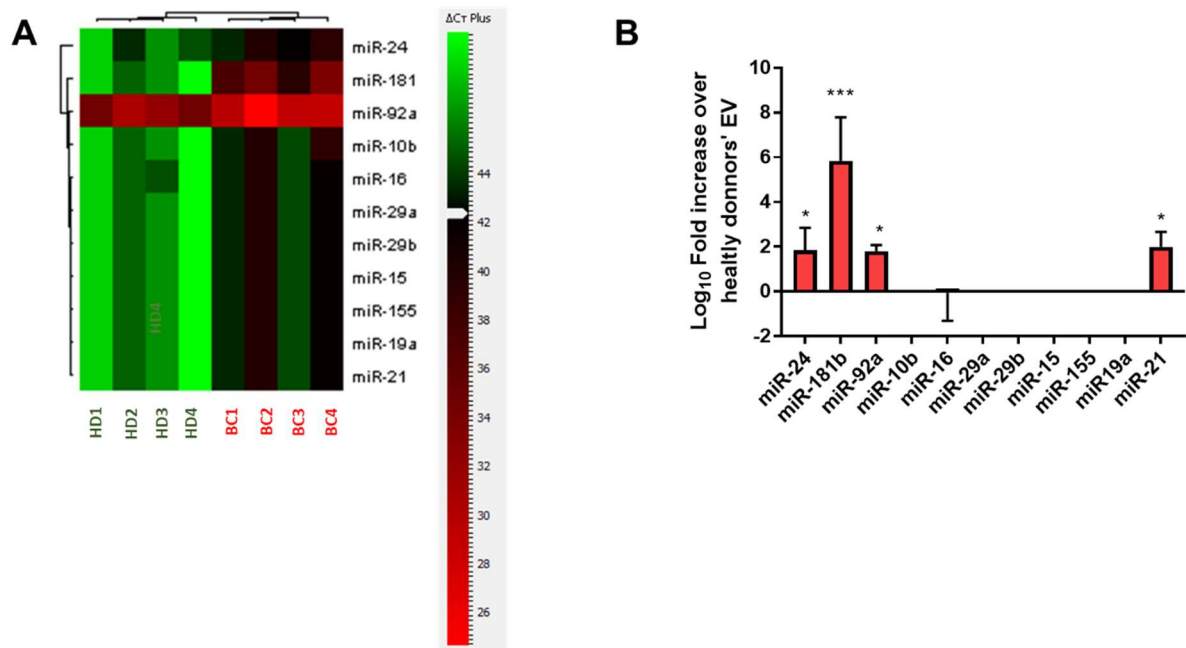


Figura 21. Análise dos miRNAs presentes em vesículas extracelulares circulantes. A análise quantitativa de miRNAs foi realizada por qPCR e os dados foram normalizados utilizando os níveis de miRNAs encontrados em EVs de doadores saudáveis. (A) Análise qualitativa da quantificação dos miRNAs avaliados (B) Dados quantitativos normalizados. As diferenças foram avaliadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

Dentre os miRNAs avaliados, o miR-181b nos chamou atenção pois sua expressão relativa aconteceu de forma intensa e restrita em EVs de pacientes com câncer de mama. Em análise dos alvos de miR-181b no genoma humano, a proteína GSKIP aparece como um dos principais alvos, possuindo Context++ score de -0,67 e P_{TC} de 0,94. A pontuação Context++ para um sítio específico é a soma da contribuição de recursos, calculada por Garcia et al., 2011: 1) contribuição do tipo de sítio, 2) contribuição de emparelhamento de 3', 3) contribuição local da UA, 4) contribuição de posição, 5) contribuição de AT (abundância alvo do local) (Garcia et al., 2011). Com isso, é considerada interação favorável valores baixos (negativos). Além disso, a probabilidade de direcionamento conservado foi boa, considerando o valor de P_{TC} próximo de 1,0. Portanto, a regulação de GSK-3 β , através da proteína de interação a GSK-3 β (GSKIP) pelo miR-181b-5p é possível e favorável.

Como descrito na sessão anterior, a atividade das isoformas GSK3 é diminuída através da fosforilação por outras proteínas quinases como Akt/proteína quinase B, p70/p85-robossomal S6 quinase, p90-ribossomal S6 quinase e PKA (Li et al., 2000; Sugden et al., 2008; Taurin et al., 2006). De forma análoga, a fosforilação da GSK também pode ser afetada pela

inibição de PI3K ou Akt (Figura suplementar 2) (Wang et al., 2011). A GSKIP é uma proteína de interação citoplasmática de GSK3- β e AKT e seu mecanismo de ação se baseia na facilitação da fosforilação de GSK3 β pela PKA no Ser-9. A perda de GSKIP em camundongos causa fenda palatina, semelhante à dos camundongos Gsk-3 $\beta^{-/-}$ (Liu et al., 2007) e letalidade perinatal por dificuldade respiratória (Deak et al., 2016). Já o nocaute de qualquer uma das subunidades da PKA não causa fenda palatina. Assim, GSKIP e GSK3 β são cruciais para o desenvolvimento craniofacial normal. Provavelmente, isso não envolve sinalização Wnt, pois os sinais Wnt aparentemente não influenciam a fosforilação do Ser-9 do GSK-3 β (Dema et al., 2016).

De forma geral, a presença do miR-181b já vem sendo demonstrada como fator de pior prognóstico em alguns tipos de câncer. Por exemplo, no trabalho desenvolvido por Nakajima e colaboradores foram identificados vários miRNAs desregulados devido à perda do supressor de tumor p53 no câncer de colorretal, dentre eles se encontra o hsa-miR-181b. Foi identificada uma superexpressão nos pacientes do hsa-miR-181b ($p=0.02$), sendo que sua presença estava significativamente associada a resposta a quimioterapia baseada no antimetabolito S-1 à base de 5-fluorouracil. (Nakajima et al., 2006). Além disso, a sinalização miR-181b/FOS/miR-21 foi identificada por desempenhar um papel crítico na progressão dos gliomas (Tao et al., 2013). Em câncer de mama foi demonstrado que no plasma de pacientes o nível de miR-181b foi significativamente aumentado em comparação com o nível encontrado em indivíduos saudáveis. Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que a superexpressão do miR-181b promoveu acentuadamente a proliferação e metástase das células tumorais de mama e estava relacionada a mecanismos de resistência a doxorrubicina (Zheng et al., 2016), além dos pacientes com maiores níveis séricos possuírem pior prognóstico (Tian et al., 2018).

Apesar de intensa busca na literatura, poucos trabalhos relatam alvos de miR-181b que correlacionam com funções imunológicas. No trabalho desenvolvido por Sun e colaboradores (2016), foi observado que a administração intravenosa sistêmica de miR-181b acumulou-se de maneira robusta nas células endoteliais do tecido adiposo e aumentou a fosforilação de Akt mediada por insulina no Ser473. Além disso, reduziu-se a disfunção endotelial, um efeito que induziu a polarização de macrófagos em direção a um fenótipo anti-inflamatório M2 no tecido adiposo branco epididimal. Esses efeitos foram associados ao aumento da óxido nítrico sintetase endotelial e à fosforilação do FoxO1, bem como à atividade do óxido nítrico no tecido adiposo branco epididimal. Em contraste, o miR-181b não afetou a fosforilação da Akt estimulada por insulina no fígado e nos músculos esqueléticos. Em abordagens de bioinformática e perfil genético realizadas pelos autores revelaram que o domínio da homologia de Pleckstrina repete a fosfatase protéica rica em leucina, uma fosfatase que

desfosforila Akt em Ser473, é um novo alvo do miR-181b. Com isso, o miR-181b reduziu a inflamação visceral da gordura e melhorou a homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina, aumentando a sinalização da insulina endotelial do tecido adiposo e a ativação do Akt/eNOS (Sun et al., 2016). Em estudos realizados por McClure e colaboradores, foi observado que MDSCs de camundongos se expandem dramaticamente na medula óssea durante a sepse tardia, e que os miRNAs miR-21 e miR-181b são aumentados em casos de sepse precoce (McClure et al., 2014).

Especificamente em células dendríticas, Zhu e colaboradores (2017) descreveram que em suas análises de busca de possíveis miRNAs envolvidos na maturação de células dendríticas, os algoritmos computacionais previram o 3'UTR de TNF- α (mRNA) como alvo de miR-181a-5p, o que foi confirmado pelos experimentos envolvendo repórter de luciferase. Além disso, descobriram que o mRNA do TNF- α foi sub-regulado pelo mimic do miR-181a-5p e significativamente regulado positivamente com o uso do inibidor do miR-181a-5p. Tomados em conjunto, identificaram que o miR-181a-5p é um regulador negativo nas respostas imunes induzidas por HMGB1, visando o mRNA do TNF- α nas DCs (Zhu et al., 2017).

No trabalho realizado por Duek e colaboradores (2014) foi realizada a caracterização de miRNAs expressos durante a maturação de macrófagos e células dendríticas utilizando estímulos diferentes: LDL, oxLDL, eLDL ou LPS. Embora muitos miRNAs sejam expressos na maturação de DC independentemente do agente de maturação específico, vários miRNAs parecem ser específicos de estímulos. Por exemplo, 14 miRNAs incluindo miR-155, miR-383-5p, miR-455, miR-9-3p ou miR-149-5p foram regulados positivamente nas quatro condições, enquanto miR-99b-3p, miR-143-3p, miR-181b e let-7e-5p foram regulados negativamente (Duek et al., 2014). Portanto, o miR-181b possui um efeito negativo na maturação de DCs, pois em condições normais responsivas a estímulos de maturação, ele se encontra regulado negativamente.

Ghorbani e colaboradores (2017) descreveram o papel de miR-181 na neuroinflamação. Eles observaram que a supressão do miR-181 foi observada após a ativação específica de antígeno ou policlonal de linfócitos, bem como em macrófagos após o tratamento com LPS. A superexpressão das sequências miméticas de miR-181a e -b reduziu a expressão gênica pró-inflamatória em macrófagos e a polarização em relação ao fenótipo M1. As sequências miméticas de miR-181a e -b inibiram a geração de Th1 em células T CD4⁺ e as sequências miméticas de miR-181a também promoveram a diferenciação de Treg (Ghorbani et al., 2017). Estes resultados corroboram os achados no presente trabalho atribuindo uma contribuição do miR-181b na modulação do fenótipo celular de Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de

pacientes com câncer de mama e sua capacidade diminuída de estimulação de linfócitos efetores e estímulo de Tregs. Além disso, Zhang e colaboradores (2015) descreveram que a regulação positiva do miR-181b em resposta ao LPS era necessária para induzir a tolerância em macrófagos (Zhang et al., 2015).

Do ponto de vista metabólico, no trabalho desenvolvido por Whang e colaboradores (2019) foi demonstrado que a inibição da expressão do miR-181b-5p prejudicou a via AKT/GSK e reduziu a glicogênese nos hepatócitos (Wang et al., 2019). Além disso, a expressão anormal da família miR-181 está intimamente relacionada ao metabolismo da gordura (Chu et al., 2015). Durante a maturação das DCs, o perfil metabólico de DCs imaturas e maduras são diferentes, passando de um fenótipo glicolítico para um fenótipo de fosforilação oxidativa (Kelly and O'Neill, 2015).

A importância do metabolismo energético foi estabelecida pela primeira vez no desenvolvimento de Mo-DCs humanos *in vitro*. O fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e a diferenciação e sobrevivência induzidas por interleucina (IL) -4 de DCs de monócitos humanos dependem do alvo de mamíferos da ativação do complexo 1 de rapamicina (mTOR) (mTORC1) via fosfoinositida 3-quinase (PI3K) e são revogadas pela rapamicina, um inibidor da mTOR/mTORC1 (Haidinger et al., 2010). A deficiência de TSC1 é acompanhada por aumento da apoptose de DCs e um aumento da atividade metabólica em DCs pode ser obtido através da inibição de Myc dependente de TSC1, um efetor a jusante do mTOR. Myc regula o catabolismo da glicose e da glutamina DCs (Wang et al., 2013b). Além de controlar a atividade da mTORC1, a AMPK é um importante regulador do metabolismo dos ácidos graxos (Byersdorfer, 2014). A perda de AMPK geralmente favorece a síntese de ácidos graxos citosólica em vez da β -oxidação de ácidos graxos mitocondrial, o que provavelmente explica a diminuição da diferenciação nos cDC1s deficientes em AMPK α 1 (Kratchmarov et al., 2018).

Portanto, as DCs em repouso mostram um metabolismo catabólico e quebram continuamente os nutrientes para geração de energia e manutenção das células. Esse estado metabólico manifesta fosforilação oxidativa ativa, impulsionado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) alimentado por oxidação de ácidos graxos e glutaminólise, e é amplamente regulado pela AMPK (Krawczyk et al., 2010). Além da glicose, as DCs em estado estacionário usam glicogênio intracelular para apoiar as demandas glicolíticas basais, que fornecem substratos metabólicos para a respiração mitocondrial (Thwe et al., 2017). Após a ativação imunogênica, as DCs frequentemente adotam um metabolismo anabólico para a geração de substratos para biossíntese e crescimento celular. A interrupção da via glicose-

piruvato prejudica significativamente a maturação das DCs, a regulação positiva das moléculas coestimuladoras, a secreção de citocinas e a capacidade estimuladora das células T a longo prazo (Wculek et al., 2019). Portanto, a ativação forçada da AMPK ou a inibição/perda podem impedir ou promover a maturação DCs, respectivamente (Carroll et al., 2013; Krawczyk et al., 2010), associando a AMPK ativa à diminuição das funções pró-inflamatórias da DC (de Lima Thomaz et al., 2018).

Dessa forma, os altos níveis de hsa-miR-181b exclusivamente em EVs de pacientes com câncer de mama podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos imunomoduladores observados nas Mo-DCs diferenciadas. Esses efeitos podem ser relacionados a regulação da via de mTOR, especificamente no ponto de regulação da GSK3. Efeitos correlacionados ou associados podem estar envolvidos nesse processo, levando em consideração que miRNAs possuem diferentes alvos e vias de sinalização são integradas nas células.

4.6 Análise da influência de EVs isoladas de sobrenadante de cultura celular de células tumorais em Mo-DCs

A fim de verificar se EVs isoladas do sobrenadante de células de tumor mamário humano possuem o mesmo efeito de EVs isoladas do plasma de pacientes com câncer de mama, realizou-se o a diferenciação de Mo-DCs tratando com EVs isoladas de células tumorais e não tumorais. Foram utilizadas as células HEK-293 (ATCC CRL-1573), célula epitelial de rim, como célula não tumoral; MCF-7 (ATCC HTB-22), célula epitelial adenocarcinoma mamário humano luminal e MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), célula epitelial de adenocarcinoma humano triplo negativa metastática. O desenho experimental foi o mesmo descrito na figura 7. Os resultados obtidos estão representados na figura 22.

EVs de MDA-MB-231 induziram alterações fenotípicas similares em Mo-DCs quando comparadas às Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes com câncer de mama (Figura 13). De forma resumida, Mo-DCs tratadas com EVs de MDA-MB-231, mesmo após maturação com LPS, apresentaram menor frequência de expressão de HLA-DR, CD11c, CD86 e CD80 (Figura 22A, B, C e D). Além disso, observou-se uma redução significativa na intensidade média de fluorescência de HLA-DR (Figura 22E) e CD86 (Figura 22G), apesar de não ser observada alteração no MFI de CD11c (Figura 22F) e CD80 (Figura 22H) em Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de MCF7 e MDA-MB-231.

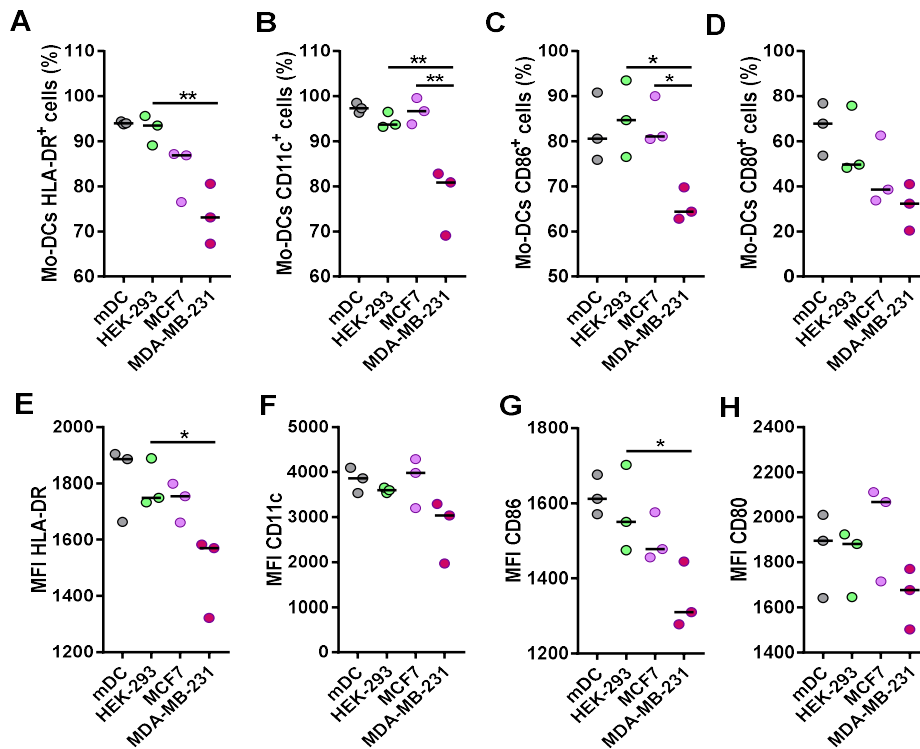


Figura 21 - EVs isoladas do sobrenadante de células tumorais de mama diminuem a expressão dos marcadores de superfície das Mo-DCs. Os monócitos foram diferenciados em DCs com IL-4 e GM-CSF, na ausência de EVs (mDC), na presença de EVs isoladas de HEK-293 ou na presença de EVs isoladas de MCF7 ou na presença de EVs de MDA-MB-231. A análise pela frequência de células positivas para (A) HLA-DR; (B) CD11c; (C) CD86; (D) CD80 ou do MFI dos marcadores (E) HLA-DR; (F) CD11c; (G) CD86; (H) CD80 foram realizados no FlowJo. As diferenças foram avaliadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Cada símbolo representa um doador de EVs diferente. Linhas representam a média geométrica. Gráficos representativos de três experimentos independentes.

Como discutido anteriormente, Mo-DCs que expressaram níveis reduzidos de moléculas importantes envolvidas na apresentação de antígenos e na ativação de linfócitos, como HLA-DR, CD80, CD86 e CD40, são menos eficazes na indução da proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Ramos et al., 2012). Resultados semelhantes também foram observados em leucemia mielóide crônica (Brown et al., 2014), câncer colorretal (Orsini et al., 2013) e neoplasia cervical (Lopes et al., 2017). Esse fenótipo é compatível com a de DCs tolerogênicas (Steinbrink et al., 2002). Piao e colaboradores (2017) também descreveram a modulação do fenótipo de macrófagos através de EVs de MDA-MB-231, bem como a indução de metástase (Piao et al., 2018).

Portanto, os efeitos observados de indução de DCs tolerogênicas por EVs de pacientes com câncer de mama também puderam ser observados sendo induzidos por EVs de MDA-MB-231, de forma acentuada. Para avaliar se as alterações fenotípicas também refletiram em uma

menor capacidade de estimular uma resposta adaptativa, foi realizado o ensaio de proliferação de linfócitos assim como representado na figura 9. Os resultados estão representados na figura 22.

Pode-se observar que, assim como Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de BC, as Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de MDA-MB-231 tiveram uma menor capacidade significativa de induzir linfócitos T CD8⁺ (Figura 22B), linfócitos CD4⁺ (Figura 22C), porém, induziram significativamente o aumento de linfócitos Treg (Figura 23D). Além disso, foi observada uma intensa indução de morte de linfócitos na co-cultura (Figura 22A).

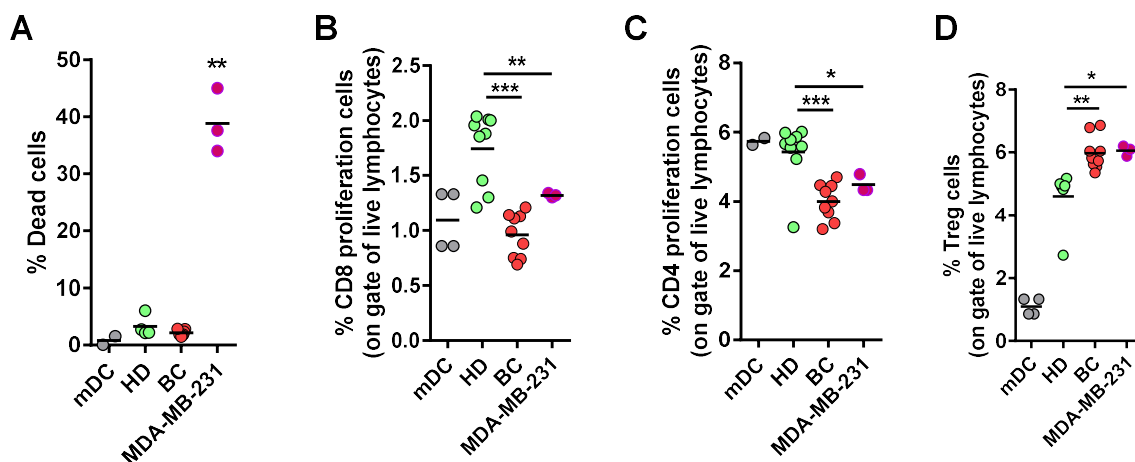


Figura 22 - Caracterização dos linfócitos em co-cultura com Mo-DCs Os linfócitos alogênicos foram cultivados com Mo-DCs diferenciadas na ausência de exossomos (mDC), presença de exossomos de doador saudável (HD) ou presença de exossomos de pacientes com câncer de mama (BC) ou com EVs isoladas do sobrenadante de cultura de MDA-MB-231. (A) porcentagem de linfócitos mortos ao final da co-cultura; (B) proliferação de linfócitos CD8⁺; (C) proliferação de linfócitos CD4⁺ e (D) indução de células Treg. Análise ANOVA e para comparação múltipla, foi realizado o teste de Tukey, * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Em relação à indução de morte celular, já foi demonstrado que vesículas podem transportar o ligante de morte programada 1 (PD-L1), inibindo a ativação, proliferação e indução de apoptose de linfócitos T (Chen et al., 2018). Yang e colaboradores descrevem o envolvimento de EVs liberadas por MCF-7 e MDA-MB-231 como carreadoras de PD-L1, sendo responsável pela indução de morte direta de linfócitos associando esse efeito com a modulação da resposta imune antitumoral no microambiente do tumor (Yang et al., 2018b). Achados similares foram obtidos por Chen e colaboradores (2018) em pacientes com melanoma metastático (Chen et al., 2018). As vesículas extracelulares tumorais agem sinergicamente com outros mecanismos como o recrutamento de células imunes com perfil supressor, como macrófagos associados a tumores (TAMs), neutrófilos associados a tumores (TANs) e células T reguladoras (Treg) e indução de tolerância de células dendríticas (Liu and Cao, 2016), a fim de promover o nicho pré-metastático. A determinação da presença de PD-L1

e PD-L2 em EVs nas culturas celulares deste trabalho se encontra como perspectiva do mesmo para elucidação dos possíveis mecanismos de indução de morte direta de linfócitos no MLR.

Portanto, conclui-se que as alterações fenotípicas e funcionais de Mo-DCs diferenciadas da presença de EVs de pacientes com câncer de mama e EVs de MDA-MB-231 são similares. Para validar os efeitos observados nos testes *in vitro*, realizou-se, posteriormente, a avaliação sistêmica da modulação do fenótipo de células imunes induzidas por EVs isoladas de célula tumoral murina, *in vivo*.

4.7 Avaliação da modulação do fenótipo de células imunes por EVs tumorais *in vivo*

A análise da modulação da ativação de linfócitos e do fenótipo de células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos e células dendríticas) foi realizada após a injeção sistêmica de EVs isoladas do sobrenadante de cultura de células 4T1. A administração sistêmica ocorreu a cada 48 horas, durante 10 dias, pela veia caudal de animais BALB/c. Após 10 dias, os animais foram eutanasiados e o baço foi coletado para análise de células imunes. A estratégia de análise utilizada está descrita nas figuras 23 e 24.

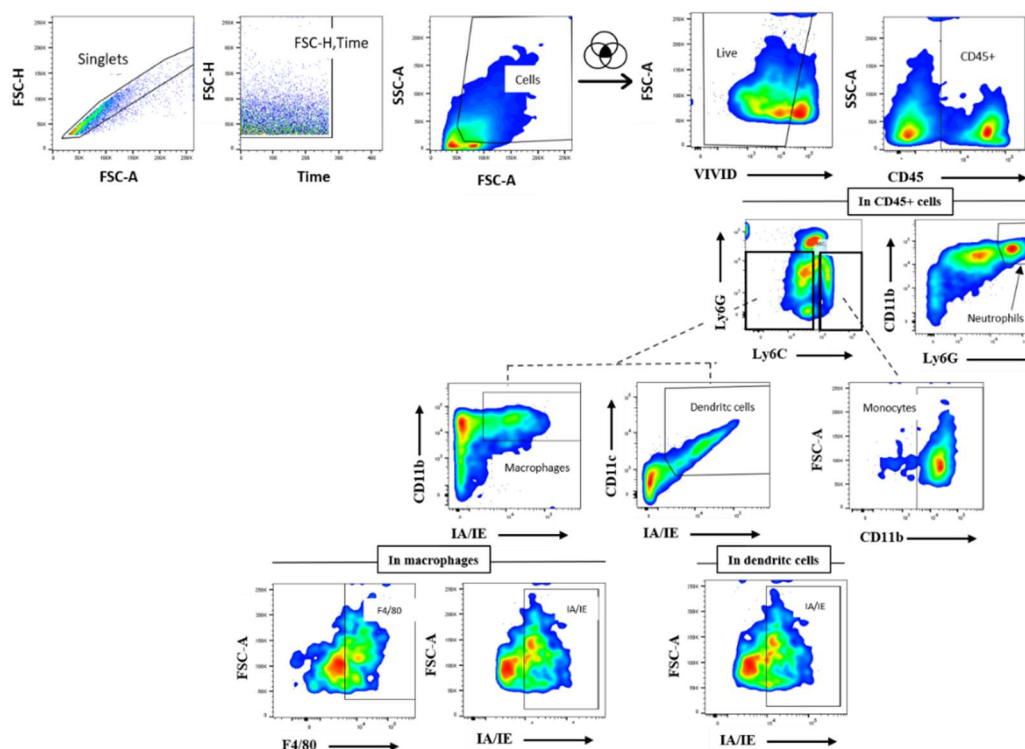


Figura 23 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células mielóides. Sequencialmente, foi realizada a delimitação dos *Singlets*, delimitação da aquisição de amostra contínua ao longo do tempo, delimitação da população celular de interesse por tamanho e granulosidade. Após isso, a análise foi restrita apenas em células viáveis VIVID⁻ e CD45⁺. Dentro dessa população foi realizada a análise da expressão dos diferentes marcadores utilizados. A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

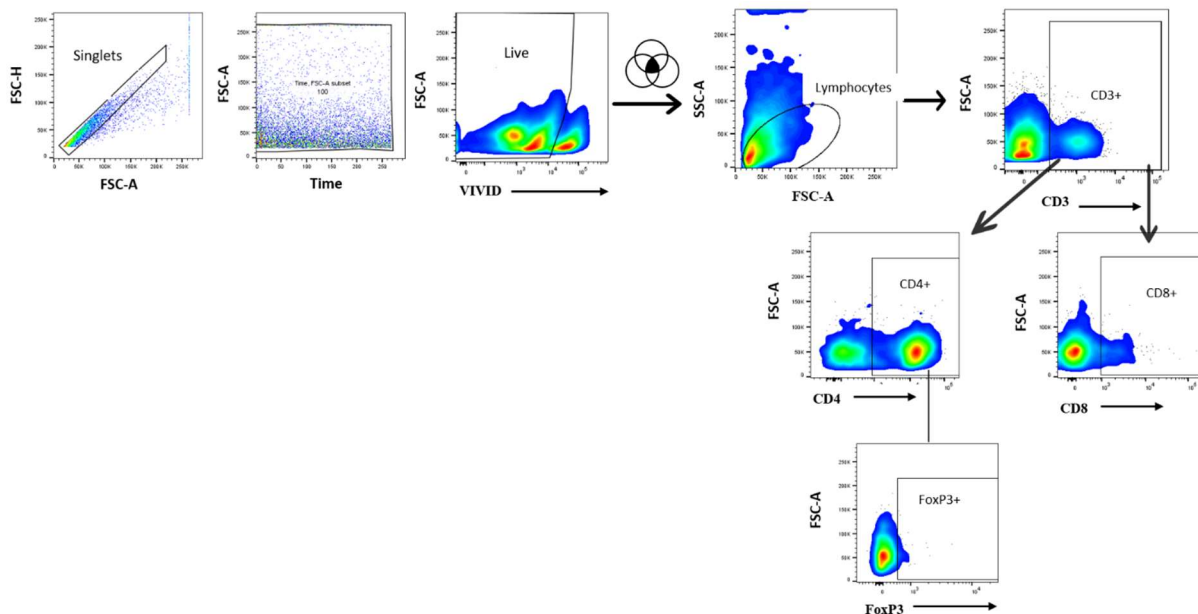


Figura 24 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células linfoides. Sequencialmente, foi realizada a delimitação dos *Singlets*, delimitação da aquisição de amostra contínua ao longo do tempo, delimitação da população celular viva. Dentro dessa população, a análise foi realizada na população de interesse: linfócitos, através da delimitação de tamanho, granulosidade e positividade paa CD3. Dentro dessa população foi realizada a análise da expressão de CD4 e CD8. Dentro da população de linfócitos CD3⁺CD4⁺ foi avaliado os linfócitos que expressavam FoxP3 (células Treg). A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

Os resultados de análise de células mieloides e linfoides do baço estão descritos na figura 25. Em relação às células mieloides, não foi observada diferença de monócitos presentes no baço dos animais tratados com PBS (controle) ou com EVs de 4T1 (EVs), porém, observou-se uma diminuição significativa na frequência de macrófagos e DCs expressando moléculas de MHC de classe II no baço de animais tratados com EVs (Figura 25A).

Nas células linfoides, observou-se uma tendência à diminuição na frequência de células T CD8⁺ (p=0,089) no baço de animais tratados com EVs. Não se observou diferença significativa de células CD4⁺, porém, teve-se um aumento significativo na frequência de células Treg (p<0,05) (Figura 25B). Apesar de não se ter observado alteração na frequência de células T CD8⁺ e CD4⁺, as células no baço de animais tratados com EVs estavam apresentando menores índices de proliferação (Figura 25C). Não foram observadas diferenças significativas no MFI de IA/IE das DCs, bem como na frequência e MFI de CD11c (dados não mostrados).

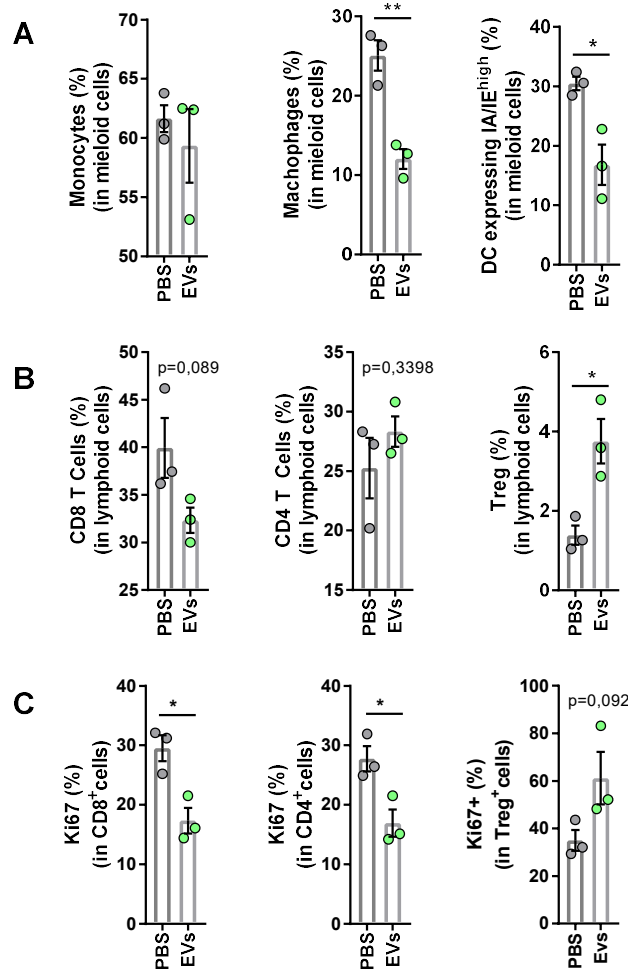


Figura 25 - Análise de células imunes presentes no baço de animais tratados ou não com EVs. Foram avaliadas (A) células mieloides; (B) células linfoides e (C) proliferação celular de linfócitos.

O microambiente do pulmão e do fígado, além do baço, são importantes para a programação dos progenitores para diferenciar DC tolerogênicas *in situ*, o que contribui para a manutenção da tolerância (Li et al., 2008). Portanto, é razoável supor que o microambiente do órgão linfoide é importante para regular o desenvolvimento e a função das células imunes, (Roosendaal and Mebius, 2011) especialmente DCs, cujas funções únicas resultam em grande parte de influências microambientais locais em diferentes órgãos ou tecidos (Qian and Cao, 2012).

Portanto, a modulação sistêmica observada nas células imunes do baço de animais BALB/c no presente trabalho fornece indícios que, de fato, *in vivo*, vesículas extracelulares podem contribuir para um estado imunossuprimido em indivíduos com câncer, conforme já demonstrado em humanos (Pinzon-Charry et al., 2007; Sisirak et al., 2012), inclusive na indução de um fenótipo alterado de DCs, tornando-se células com reduzida capacidade de

apresentação de antígenos (Gabrilovich, 2004; Harimoto et al., 2013; Karthaus et al., 2012; Krempski et al., 2011).

4.8 Avaliação da resposta imunológica *in vivo* à *Leishmania major* em animais com câncer de mama induzido e tratado com EVs de células tumorais de mama murina

A fim de comprovar a modulação da resposta imune por EVs liberadas pelo tumor ou liberadas por células tumorais de câncer de mama, foi realizada a análise de responsividade à infecção de *L. major* e indução de tumor de mama. O ensaio *in vivo* foi caracterizado por diferentes grupos experimentais descritos na Figura 10. De forma resumida:

- Grupo 1 representa animais que receberam tratamento com PBS nos mesmos dias de tratamento dos animais dos grupos 5 e 6;
- Grupo 2 representa o grupo controle da infecção por *L. major*;
- Grupo 3 representa o grupo controle de tumor mamário induzido;
- Grupo 4 representa animais com tumor e infectados com *L. major* a fim de determinar modulação da resposta à infecção, considerando EVs sistêmicas liberadas pelo tumor e microambiente tumoral;
- Grupo 5 considera o efeito isolado de EVs apenas liberadas por células tumorais e sua modulação frente a infecção por *L. major*;
- Grupo 6 representa o efeito do tumor (+microambiente) acrescido do efeito de EVs exógenas injetadas de células tumorais murinas frente à infecção por *L. major*.

Foram avaliados diferentes parâmetros no ensaio *in vivo*. Inicialmente, ao longo do experimento, foram acompanhados o peso do animal, espessura da orelha de animais infectados com *L. major* e crescimento do tumor em animais que tiveram tumor mamário induzido com 4T1. As fotografias das orelhas dos animais após 4 semanas de infecção (Figura 26A), 5 semanas de infecção (Figura 26B) e os tumores representativos dos grupos com tumor induzido (Figura 26C) estão descritas abaixo. Apenas com a observação morfológica presente na figura 27 é possível verificar a evolução do processo infeccioso da *L. major*, bem como a identificação de uma maior área acometida relacionada à lesão no grupo “Infecção + tumor”. O tumor no grupo “infecção + tumor” também teve maior volume quando comparado aos outros grupos com tumor mamário induzido.

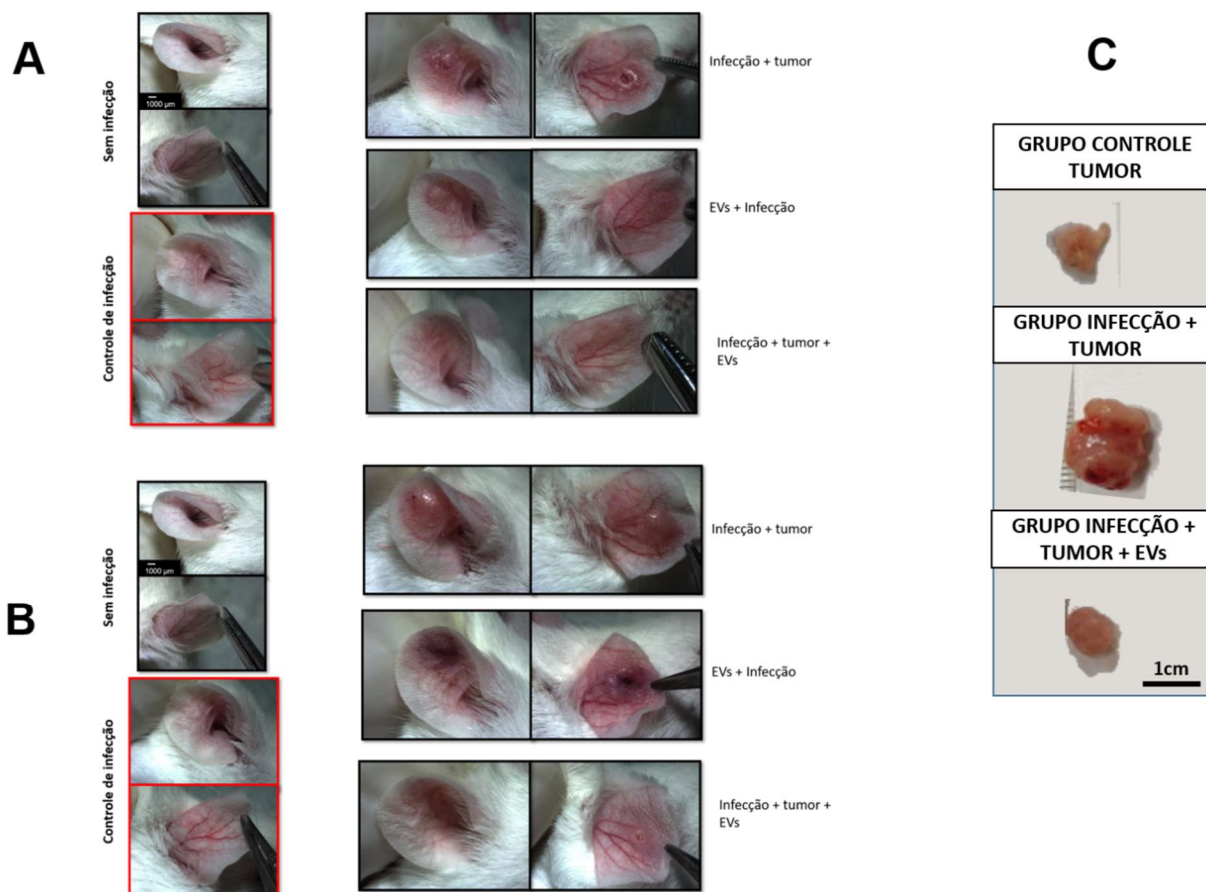


Figura 26 - Análise macroscópica da lesão por *L. major* e tumor induzido por 4T1. Imagens representativas da lesão em (A) 4 semanas; (B) 5 semanas e (C) Imagens do tumor após eutanásia, fim do experimento.

Os valores quantitativos de dados coletados ao longo do experimento estão representados na figura 28. Pôde-se observar que os animais ao longo de 5 semanas de experimento conseguiram ganhar peso, porém, no grupo “EVs + infecção” foi observado um menor ganho, no entanto, sem diferença significativa (Figura 27A). Em relação ao crescimento tumoral quantificado por paquímetro, foi observado que, de fato, o grupo “Infecção+tumor” possuiu maior volume tumoral, desde a 4ª semana do experimento (Figura 27B). Confirmando a visualização na figura 27A e B, o grupo “Infecção + tumor” possuiu uma maior espessura significativa no local da lesão relacionada à infecção por *L. major*, a partir da 4ª semana de infecção (Figura 27C). Porém, ao realizar a quantificação da carga parasitária na orelha dos animais infectados por *L. major*, não foi observada diferença (Figura 27D). Foi observada uma maior carga parasitária no baço de animais tratados com EVs e infectados, e uma menor carga no grupo “Tumor+infecção+EVs” (Figura 27E). No fígado, não foi identificado parasitemia de *L. major*, com exceção de um animal do grupo “Tumor+infecção” (Figura 27F). Como foi identificado em apenas um animal, como fato isolado, o achado deve ser confirmado com o aumento do “n” experimental para melhor comprovação. A atividade de arginase foi

determinada e, interessantemente, foi praticamente abolida na presença de tratamento de EVs, seja no grupo “EV+Infecção” ou no grupo “Tumor+infecção+EVs” (figura 27G). Isso demonstra que EVs isoladas da cultura de células 4T1 podem ter um efeito drástico na atividade de arginase. Para tentar explicar esses achados, o perfil de células inflamatórias foi avaliado.

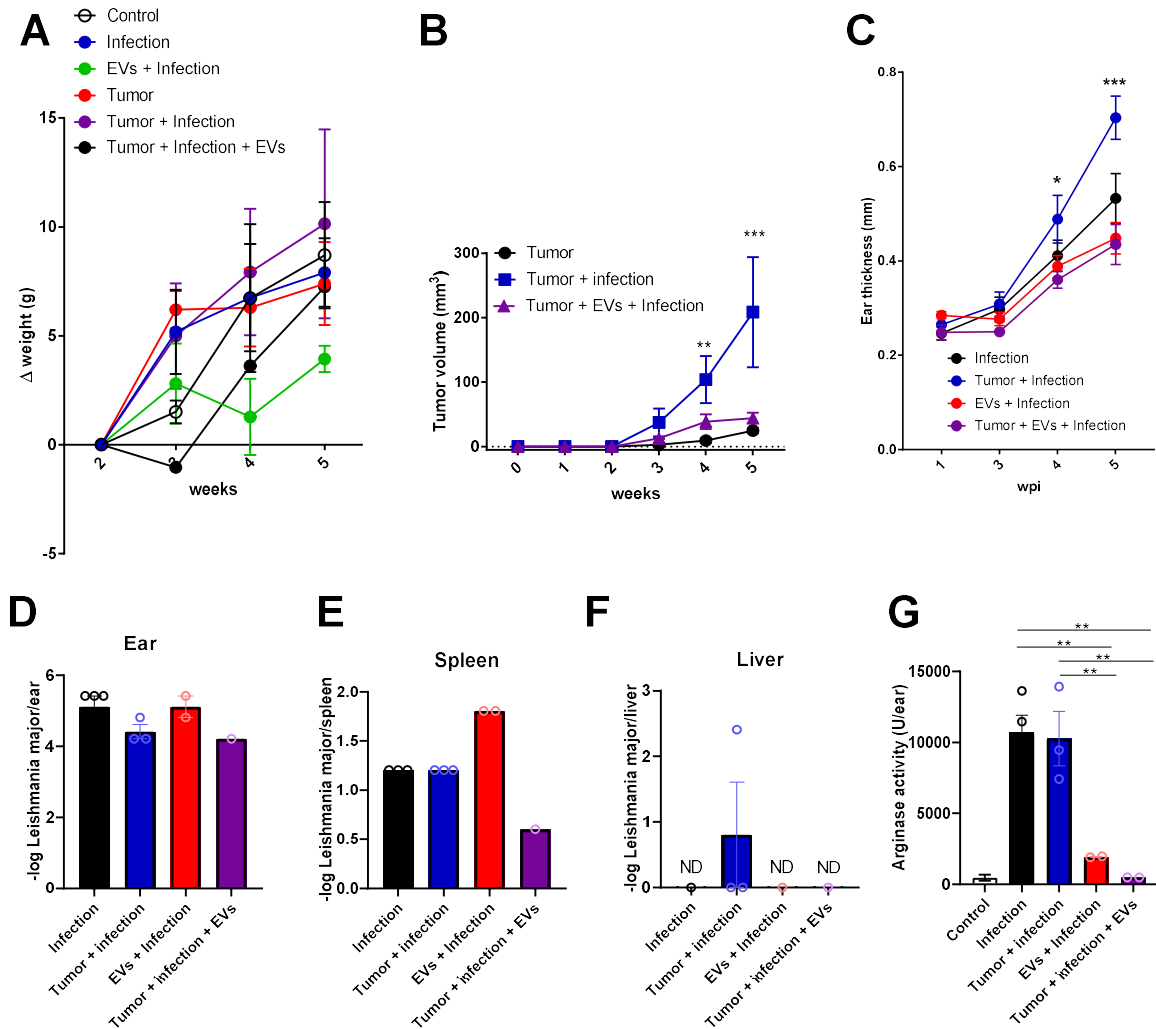


Figura 27 - Quantificação de parâmetros mensurados no ensaio *in vivo*. (A) peso dos animais; (B) Tumor induzido por 4T1; (C) Espessura da orelha dos animais infectados; carga parasitária na (D) orelha, (E) baço e (F) fígado; e (G) atividade de arginase na orelha dos animais infectados e não infectados.

Pode-se observar que o tamanho da lesão (Figura 26 A e B) não se correlacionou com a carga parasitária (Figura 27), assim como no trabalho realizado por Baldwin e colaboradores (Baldwin et al., 2003).

A análise de células mieloides e linfoides nas orelhas dos animais infetados com *L. major* foi avaliada por citometria de fluxo. A estratégia de gates de células mieloides foi a

mesma descrita na figura 23. Na figura 28 consta a análise de células mieloides nas orelhas dos animais dos grupos que foram infectados com *L. major*, além do controle sem infecção (representado como círculos vazios de cor cinza). Pôde-se observar que, nas orelhas dos grupos infectados, independente de qual condição, observa-se um aumento na frequência de células dendríticas (dentro da população de células mieloides), porém, não houve diferença significativa entre os grupos infectados (Figura 28A). Em relação à expressão de moléculas de MHC de classe II nas DCs presentes nas orelhas infectadas, observou-se que no grupo “Tumor+EVs+Infecção” se teve uma menor frequência de células positivas (Figura 28B), em relação ao grupo “EVs+Infecção” ou “Tumor+Infecção”. O mesmo fenômeno ocorreu ao avaliar a frequência de macrófagos expressando moléculas de MHC de classe II (Figura 28D). Em relação ao infiltrado de macrófagos, observou-se um aumento significativo de macrófagos infiltrantes, exceto no grupo “Tumor+EVs+Infecção” (Figura 28C). Não foi observada alteração na frequência de macrófagos expressando F4/80 (Figura 29E). Interessantemente, observou-se um intenso infiltrado de neutrófilos no grupo controle de infecção por *L. major*, porém, um aumento ainda maior foi observado no grupo “Tumor+ Infecção” (Figura 28F). A frequência de monócitos infiltrantes não teve diferença entre os grupos experimentais (Figura 28G).

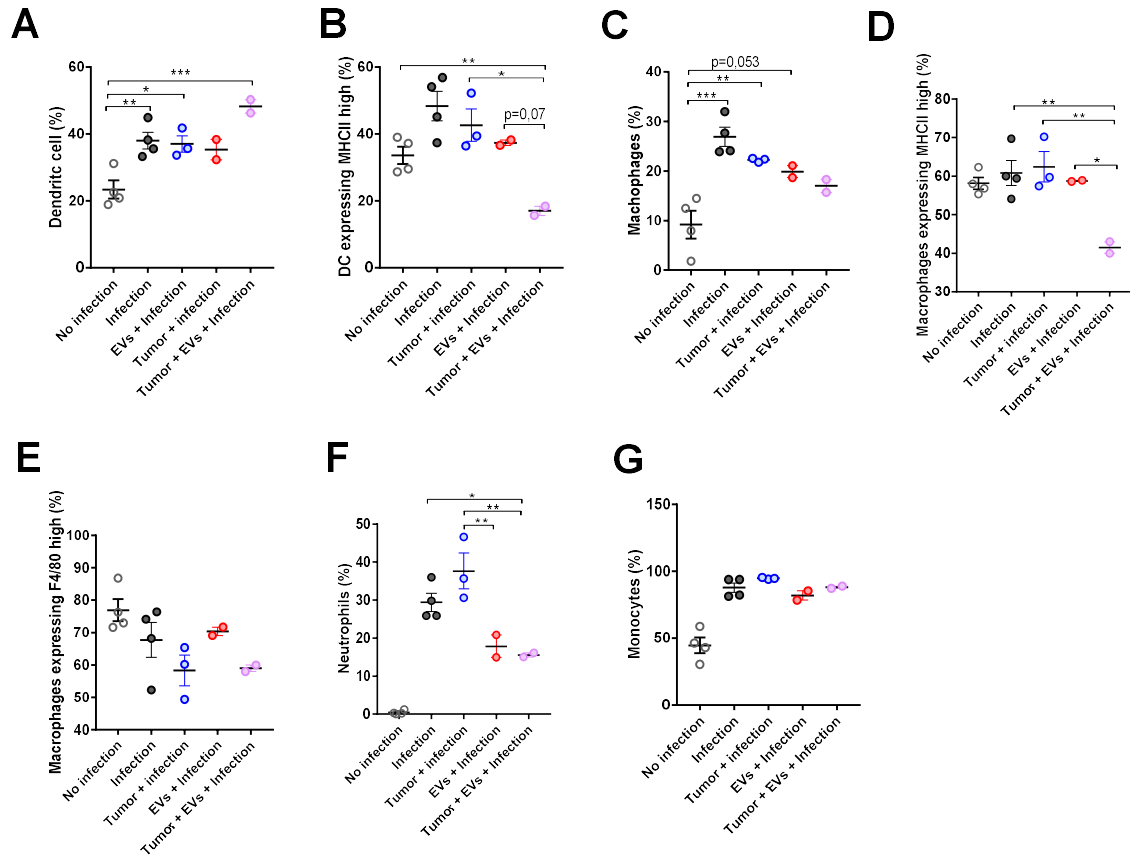


Figura 28 - Análise de células mieloides nas orelhas de animais infectados com *L. major*. (A) frequência de células dendríticas; (B) frequência de células dendríticas expressando moléculas de MHC II; (C) frequência de macrófagos; (D) frequência de macrófagos expressando moléculas de MHC II; (E) frequência de macrófagos expressando F4/80; (F) frequência de neutrófilos e (G) frequência de monócitos.

O infiltrado de células linfoides também foi avaliado por citometria de fluxo e a estratégia de gates utilizada está representada na figura 29.

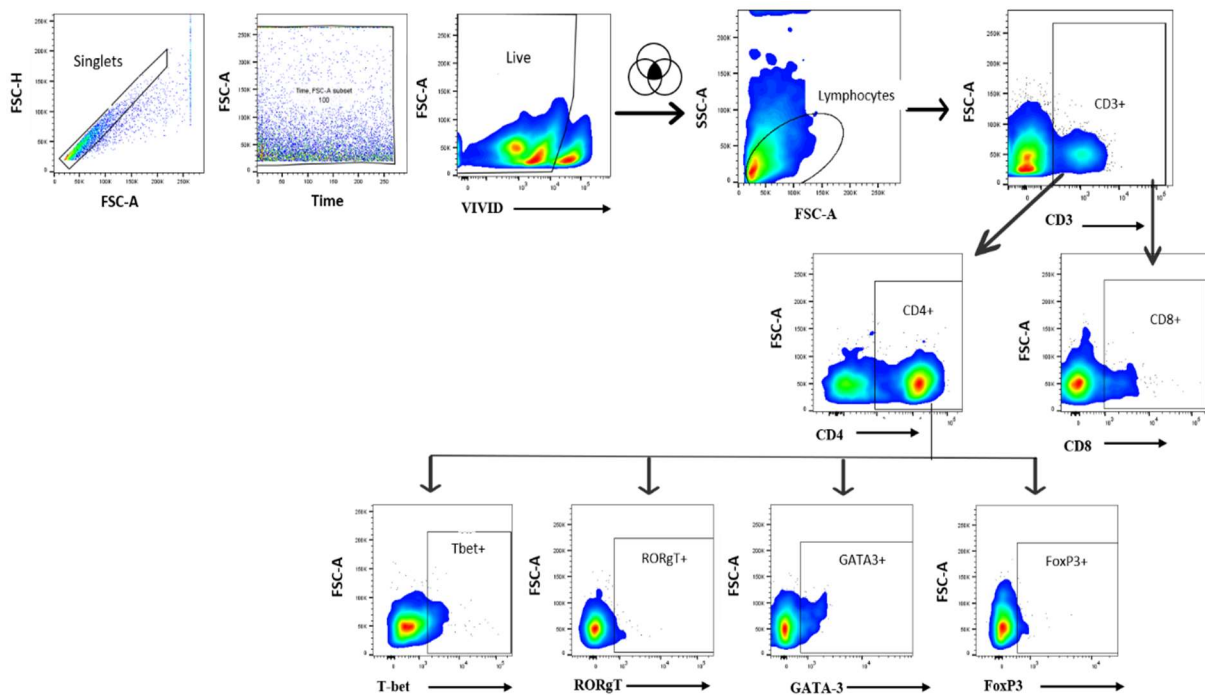


Figura 29 - Dot plots representativos da estratégia de gates utilizada para análise de células linfoides. Sequencialmente, foi realizada a delimitação dos *Singlets*, delimitação da aquisição de amostra contínua ao longo do tempo, delimitação da população celular viva. Dentro dessa população, a análise foi realizada na população de interesse: linfócitos, através da delimitação de tamanho, granulocidade e positividade para CD3. Dentro dessa população foi realizada a análise da expressão dos diferentes marcadores. A análise foi feita com a utilização do *software* FlowJo 10.6.2 (Tree Stars Inc.).

Os resultados da análise de células linfoides estão descritos na figura 30. Pôde-se observar que, nos grupos em que se teve o tratamento dos animais com EVs (EVs+Infecção e Tumor+EVs+Infecção), foi observada uma redução significativa do infiltrado de células T CD8+, porém, o infiltrado ainda se mostrou maior quando comparado à orelha sem infecção (Figura 30A). Em relação ao infiltrado de células T CD4⁺, observou-se um aumento em relação ao controle sem infecção, porém, no grupo “Tumor+EVs+Infecção” se teve uma redução significativa do infiltrado em relação ao controle de infecção e ao grupo “Tumor+Infecção” (Figura 30B). Interessantemente, observou-se uma frequência aumentada significativamente de linfócitos Tregs apenas no grupo “Tumor+infecção” (Figura 30C). Observou-se aumento significativo de células T CD4⁺ Tbet⁺ no grupo controle de infecção e “Tumor+infecção” (Figura 30D), aumento significativo de células T CD4⁺ GATA-3⁺ exclusivamente nos grupos que possuíam tumor ativo e/ou que foram tratados com EVs (Figura 30E) e aumento de células T CD4⁺ RORg-T⁺ apenas nos grupos tratados com EVs (Figura 30F).

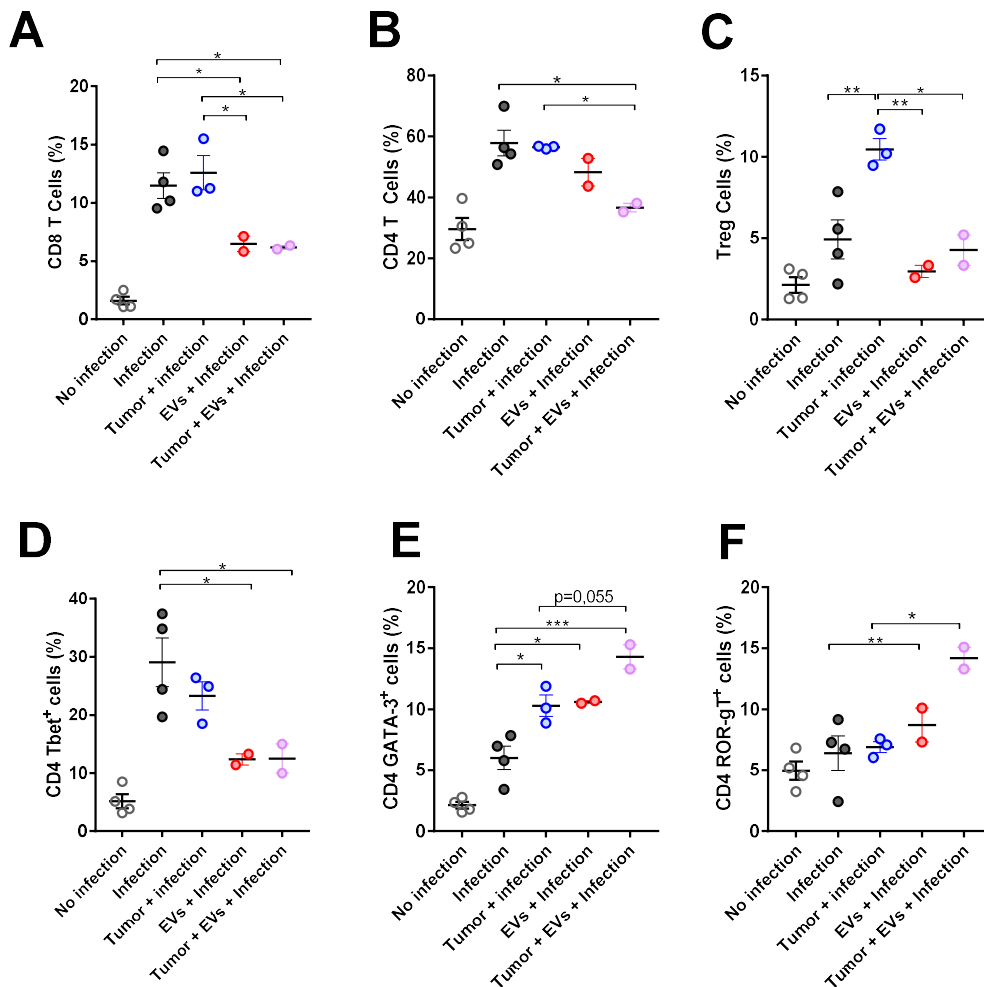


Figura 30 - Análise de células linfoides nas orelhas de animais infectados com *L. major*. (A) frequência de células T CD8⁺; (B) frequência de células T CD4⁺; (C) frequência de células Tregs; (D) frequência de células T CD4⁺Tbet⁺; (E) frequência de células T CD4⁺GATA-3⁺; (F) frequência de células T CD4⁺ROR-gT⁺.

Camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *L. major*. Naturalmente, animais BALB/c produzem citocinas majoritariamente do tipo Th2, em particular a interleucina-4 (IL-4), que demonstrou estar associada à progressão e suscetibilidade da doença. Em nosso experimento, dois animais morreram durante o curso dos ensaios *in vivo* (ambos nos grupos com tratamento com EVs). O motivo das mortes observadas em animais dos grupos experimentais de tratamento com EVs devem ser melhor exploradas com o aumento do “n” experimental. As células Treg boas produtoras de IL-10 desempenham um papel na promoção da doença, expandindo ou regulando a população Th2 produtoras de IL-4 (Belkaid, 2003). A gravidade da lesão foi associada à produção de IL-17, que promove a imigração de neutrófilos e a progressão da lesão em camundongos BALB/c (Lopez Kostka et al., 2009).

Neste sentido, em modelos experimentais da infecção por *L. major*, vários tipos de células são encontrados nas lesões: neutrófilos (Lima and Titus, 1996), macrófagos (Belkaid et

al., 2000), eosinófilos (Belkaid et al., 2000), linfócitos (McElrath et al., 1987), mastócitos (Cangussu et al., 2009) e células NK (Muller et al., 2001). Essas células desempenham um papel durante as diferentes fases da infecção: (i) fase silenciosa (sem formação de lesão ou detecção de inflamação) com invasão parasitária de macrófagos e neutrófilos residentes na pele; (ii) desenvolvimento de lesões associadas à migração e ativação de células do sistema imunológico inato (mastócitos, neutrófilos, monócitos); (iii) involução da lesão com migração de células dendríticas e células T; e (iv) fase crônica caracterizada pela resolução da lesão e associada à persistência do parasita, principalmente em macrófagos, e imunidade ao longo da vida (Belkaid et al., 2000).

Assim, a imunidade a *L. major* depende de vários tipos de células que cooperam para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz e protetora. Os macrófagos de perfil M2 são fundamentais no entendimento da suscetibilidade observada em camundongos BALB/c, devido à sua ativação ser em resposta a citocinas do perfil imunológico Th2. Durante a infecção por *L. major*, camundongos BALB/c apresentam produção contínua de IL-4, impossibilitando a produção de NO pelos macrófagos e favorecendo a metabolização da L-arginina pela enzima arginase I, expressa também em células dendríticas (DC) nas mesmas condições. Dessarte, ocorre a produção de poliaminas, essenciais na replicação parasitária (Corraliza et al., 1995; Modolell et al., 1995; Munder et al., 1999). Porém, neste trabalho observou-se que ocorreu uma diminuição de DCs e macrófagos no infiltrado inflamatório, expressando altas quantidades de moléculas de MHC II (portanto ativados) nos grupos tratados com EVs (Figura 29B, C e D). Este efeito corrobora a anulação da atividade de arginase I nos grupos tratados com EVs (Figura 28F), pois é necessário infiltrado principalmente de macrófagos e DCs para produção de arginase.

Como esperado, em camundongos BALB/c, lesões graves não cicatrizantes foram observadas (Figura 26A e B) e foram associadas a uma resposta imune clássica de Th2 (Baldwin et al., 2003), porém, a resposta Th2 foi acentuada significativamente em animais com tumor associado e/ou tratados com EVs de célula tumoral, quando comparado aos grupo só com infecção (Figura 30E).

De forma geral, verificou-se que EVs de células 4T1 induziram uma modulação sistêmica imune, a fim de diminuir de forma geral o infiltrado de células imunes, incluindo DCs e macrófagos. Estas, são as principais células imunes na promoção da proliferação do parasita não só por servirem de células hospedeiras, mas também ao fornecer poliaminas após

a atividade de arginase. Entretanto, a injeção de EVs no grupo de animais infectados, reduziu significativamente a expressão de arginase na lesão, redução essa dissoante do aumento do perfil do tipo 2, observado pelo aumento de linfócitos expressando GATA3. Tal observação sugere que as EVs possam ter um mecanismo de modulação de arginase nos macrófagos e DCs, talvez por induzir um perfil tolerogênico, e não do tipo 2.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A homeostase celular normal depende da troca de materiais biológicos através das membranas e esse transporte é facilitado através de vesículas que compartimentam a carga até seu destino apropriado. No contexto tumoral, as vesículas extracelulares vêm sendo descritas como mediadores na progressão tumoral e indução de metástases a partir da transferência de moléculas bioativas entre as células tumorais e outras células do microambientes tumoral e distantes (Tai et al., 2018b). No presente trabalho foi possível isolar vesículas extracelulares do plasma de pacientes com câncer de mama, de doadores saudáveis, além de sobrenadante de cultura celular de células imortalizadas humanas e murinas. Foi possível a caracterização delas por diferentes técnicas, como o analisador de nanopartículas, microscopia eletônica de transmissão e western blotting. As características físicas e morfológicas foram compatíveis com as encontradas em outros trabalhos.

Já tem sido relatado que células dendríticas de pacientes com câncer estão funcionalmente comprometidas (Pinzon-Charry et al., 2007), além de possuírem seu fenótipo alterado, tornando-se células com reduzida capacidade de apresentação de antígenos (Gabrilovich, 2004; Harimoto et al., 2013; Karthaus et al., 2012; Krempsi et al., 2011). Pacientes com câncer de mama, além de possuírem DCs circulantes com fenótipo alterado, quando se induz monócitos a se diferenciarem em DCs (Mo-DCs), ainda assim é gerado Mo-DCs com fenótipo alterado com baixa capacidade de ativação de resposta imune adaptativa (Ramos et al., 2012). Assim, investigamos se EVs poderiam estar envolvidas na modulação do fenótipo de DCs. Para isso, utilizamos modelo de diferenciação de Mo-DCs in vitro e também os efeitos da injeção de EVs in vivo.

De fato, foi possível a identificação, caracterização e de EVs isoladas do plasma de pacientes com câncer de mama e a determinação de que as EVs possuem a capacidade de modular fenotipicamente Mo-DCs diferenciadas de monócitos saudáveis a um perfil tolerogênico (Figura 13). Além disso, essas alterações fenotípicas induzem alterações funcionais, diminuindo a capacidade das Mo-DCs de induzirem a proliferação de linfócitos T

CD4⁺ e CD8⁺, indução de anergia celular de linfócitos efetores, além da indução de linfócitos Treg funcionais, caracterizando um perfil anti-inflamatório (Figuras 15 e 17). O perfil de secreção de citocinas em co-cultura também teve um perfil anti-inflamatório (Figura 18). Observou-se que efeitos moduladores similares eram obtidos quando se gerava Mo-DCs na presença de EVs de das linhagens tumorais humanas MCF7 e MDA-MB-231 (de forma mais acentuada).

Através da análise de vias de sinalização alteradas em Mo-DCs foi possível a identificação de uma menor ativação da via de mTOR em Mo-DCs diferenciadas na presença de EVs de pacientes, após ativação com LPS. A via de mTOR é intimamente relacionada com a maturação de células dendríticas. Dentre as proteínas da via, foi observado uma ativação permanente de GSK-3 em Mo-DCs diferenciada com BC EVs (Figura 19). Este fenótipo poderia estar relacionado ao perfil tolerogênico observado nas DCs deste grupo. A fim de estudar o mecanismo molecular para tal observação, buscamos de forma particular miRNAs que poderiam estar enriquecidos apenas em EVs de pacientes com câncer de mama que seriam capazes de explicar essas observações. Identificamos o miR-181b-5p, extraordinariamente enriquecido em EVs de pacientes e regulador da proteína de interação a GSK-3 β (GSKIP) (Figura 21). No momento, o grupo de pesquisa de nosso laboratório está em fase de importação de todo sistema necessário para realização de testes *in vitro* de inibição do miR-181b-5p para possível visualização total ou parcial do fenótipo observado nesse trabalho.

Os ensaios *in vivo* foram realizados para possível observação dos fenótipos obtidos *in vitro*, uma vez que é um sistema muito mais complexo ao considerar variáveis indeterminadas que foram excluídas em ensaios *in vitro*. Inicialmente, observou-se que o uso sistêmico de EVs de linhagem de tumor de mama causam redução do perfil de maturação de DCs e aumento da porcentagem de Tregs no baço, dados coerentes com nossas observações *in vitro*. Para verificar a repercussão dessas alterações em modelo de infecção, foi escolhido o modelo de infecção de *major* por ser um modelo bem caracterizado em BALB/c, visto que a linhagem utilizada (4T1) induz tumor em animais BALB/c ou imunossuprimidos. Foi possível a identificação de modulação de resposta imune frente à infecção por *L. major*, observando-se um menor infiltrado inflamatório de células responsáveis por mediar uma resposta imune contra o parasita, além da observação de uma acentuada resposta Th2, maior lesão, combinada a um maior crescimento tumoral nos animais “Infectados+tumor”. A figura abaixo representa o resumo gráfico da tese.

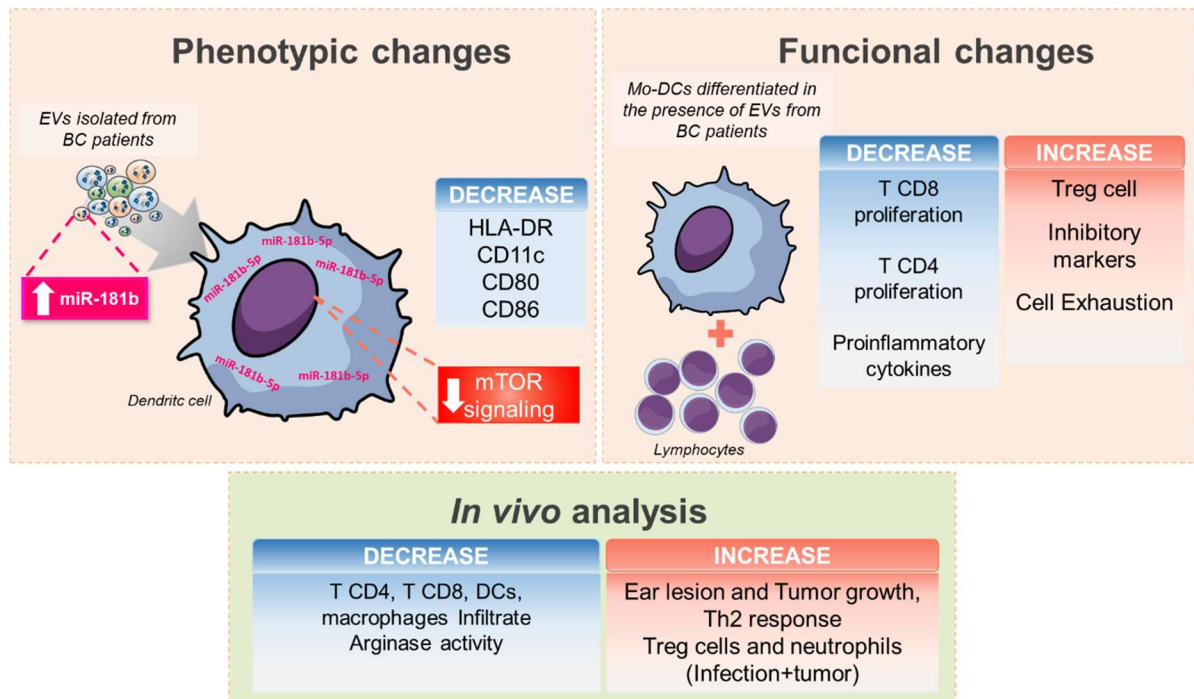


Figura 31 - Resumo gráfico da tese. Foi verificado que vesículas extracelulares de pacientes com câncer de mama induzem alterações fenotípicas em células dendríticas diferenciadas *in vitro*, induzindo um fenótipo toletogênico. Este perfil, tem uma menor capacidade de estimulação de linfócitos T efetores, apesar de induzir linfócitos Treg. EVs de pacientes estão enriquecidos de miR-181b-5p que está correlacionada com uma menor ativação da via de mTOR, pela regulação de GSK3-β. Os resultados *in vivo* correlacionam com os achados *in vitro*, devido a modulação sistêmica da resposta imune frente ao modelo de infecção de *Leishmania major*, na presença de EVs e/ou tumor.

Como resultado dos complexos mecanismos reguladores e da comunicação mediada por vesículas extracelulares entre células tumorais e células estromais e sistêmicas, os detalhes desses processos requerem uma investigação mais aprofundada. O presente estudo se mostrou inovador pois é o primeiro a implicar as vesículas extracelulares como uma das causas da modulação imunológica sistêmica de DCs em pacientes com câncer. Após a identificação da versalidade de funções de vesículas extracelulares na modulação e comunicação celular em condições fisiológicas e patológicas, muitos estudos apontam-as como um bom alvo terapêutico estreitamente alinhado com o desenvolvimento da medicina de precisão. E neste trabalho foi possível a identificação de um miRNA altamente e exclusivamente presente em pequenas EVs de pacientes com câncer que possui uma atividade biológica na indução de um fenótipo tolerogênico de DCs fornecendo um excelente ponto de intervenção farmacológica. Por fim, o hsa-miR-1815b pode ser caracterizado como um possível biomarcadores promissor por ter sido identificado em elevados níveis unicamente em EVs de pacientes recém diagnosticados com câncer de mama não metastático. A validação em um “n” populacional é necessária e se encontra como perspectiva do presente estudo.

6. REFERÊNCIAS

- Abels, E.R., and Breakefield, X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology* 36, 301-312.
- Acuto, O., Di Bartolo, V., and Michel, F. (2008). Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nature reviews Immunology* 8, 699-712.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4.
- Ahmed, K.A., and Xiang, J. (2011). Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 1458-1473.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology* 113, 1-11.
- Alajez, N.M., Lenarduzzi, M., Ito, E., Hui, A.B., Shi, W., Bruce, J., Yue, S., Huang, S.H., Xu, W., Waldron, J., *et al.* (2011). MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer research* 71, 2381-2391.
- Alessandrini, A., De Haseth, S., Fray, M., Miyajima, M., Colvin, R.B., Williams, W.W., Benedict Cosimi, A., and Benichou, G. (2011). Dendritic cell maturation occurs through the inhibition of GSK-3beta. *Cellular immunology* 270, 114-125.
- Alexander, M., Hu, R., Runtsch, M.C., Kagele, D.A., Mosbrugger, T.L., Tolmachova, T., Seabra, M.C., Round, J.L., Ward, D.M., and O'Connell, R.M. (2015). Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nature communications* 6, 7321.
- Alfonsi, R., Grassi, L., Signore, M., and Bonci, D. (2018). The Double Face of Exosome-Carried MicroRNAs in Cancer Immunomodulation. *International journal of molecular sciences* 19.
- Ali, A., Hoeflich, K.P., and Woodgett, J.R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 101, 2527-2540.
- Alunni-Fabbroni, M., Majunke, L., Trapp, E.K., Tzschaschel, M., Mahner, S., Fasching, P.A., Fehm, T., Schneeweiss, A., Beck, T., Lorenz, R., *et al.* (2018). Whole blood microRNAs as potential biomarkers in post-operative early breast cancer patients. *BMC cancer* 18, 141.
- Alvarez, K.L.F., Beldi, M., Sarmanho, F., Rossetti, R.A.M., Silveira, C.R.F., Mota, G.R., Andreoli, M.A., Caruso, E.D.C., Kamillos, M.F., Souza, A.M., *et al.* (2017). Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. *Scientific reports* 7, 9002.
- Amit, M., Takahashi, H., Dragomir, M.P., Lindemann, A., Gleber-Netto, F.O., Pickering, C.R., Anfossi, S., Osman, A.A., Cai, Y., Wang, R., *et al.* (2020). Loss of p53 drives neuron reprogramming in head and neck cancer. *Nature* 578, 449-454.
- Ammirante, M., Luo, J.L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., and Karin, M. (2010). B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* 464, 302-305.
- Anderson, A.C. (2012). Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity. *Current opinion in immunology* 24, 213-216.

- Anderson, M.E., and Siahaan, T.J. (2003). Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 24, 487-501.
- Andoh, Y., Makino, N., and Yamakawa, M. (2013). Dendritic cells fused with different pancreatic carcinoma cells induce different T-cell responses. *OncoTargets and therapy* 6, 29-40.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., *et al.* (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *The Journal of experimental medicine* 195, 1303-1316.
- Aste-Amezaga, M., D'Andrea, A., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1994). Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cellular immunology* 156, 480-492.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* 27, 669-692.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., *et al.* (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology* 14, 677-685.
- Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A., and Rothman, J.E. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39, 405-416.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology* 14, 649-683.
- Baldwin, T.M., Elso, C., Curtis, J., Buckingham, L., and Handman, E. (2003). The site of *Leishmania* major infection determines disease severity and immune responses. *Infection and immunity* 71, 6830-6834.
- Baleeiro, R.B., Anselmo, L.B., Soares, F.A., Pinto, C.A., Ramos, O., Gross, J.L., Haddad, F., Younes, R.N., Tomiyoshi, M.Y., Bergami-Santos, P.C., *et al.* (2008). High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 57, 1335-1345.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baran, J., Baj-Krzyworzeka, M., Weglarczyk, K., Szatanek, R., Zembala, M., Barbasz, J., Czupryna, A., Szczepanik, A., and Zembala, M. (2010). Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59, 841-850.
- Baroni, S., Romero-Cordoba, S., Plantamura, I., Dugo, M., D'Ippolito, E., Cataldo, A., Cosentino, G., Angeloni, V., Rossini, A., Daidone, M.G., *et al.* (2016). Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts. *Cell death & disease* 7, e2312.
- Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C.J., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2005). CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *International immunology* 17, 279-288.
- Battisti, F., Napoletano, C., Rahimi Koshkaki, H., Belleudi, F., Zizzari, I.G., Ruscito, I., Palchetti, S., Bellati, F., Benedetti Panici, P., Torrasi, M.R., *et al.* (2017). Tumor-Derived Microvesicles Modulate Antigen Cross-

Processing via Reactive Oxygen Species-Mediated Alkalinization of Phagosomal Compartment in Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* 8, 1179.

- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., and Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Schnurch, H.G., Gusterson, B.A., and Bender, H.G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine* 75, 429-439.
- Beg, A.A., and Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Belkaid, Y. (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert opinion on biological therapy* 3, 875-885.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D. (2000). A natural model of Leishmania major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology* 165, 969-977.
- Bergmann, C., Strauss, L., Wieckowski, E., Czystowska, M., Albers, A., Wang, Y., Zeidler, R., Lang, S., and Whiteside, T.L. (2009). Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. *Head Neck* 31, 371-380.
- Bernatchez, C., Haymaker, C.L., Hurwitz, M.E., Kluger, H.M., Tetzlaff, M.T., Jackson, N., Gergel, I., Tagliaferri, M.A., Zalevsky, J., and Hoch, U. (2017). Effect of a novel IL-2 cytokine immune agonist (NKTR-214) on proliferating CD8+ T cells and PD-1 expression on immune cells in the tumor microenvironment in patients with prior checkpoint therapy (American Society of Clinical Oncology).
- Beurel, E., Grieco, S.F., and Jope, R.S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics* 148, 114-131.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Thery, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer research* 72, 4920-4930.
- Boks, M.A., Kager-Groenland, J.R., Haasjes, M.S., Zwaginga, J.J., van Ham, S.M., and ten Brinke, A. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clinical immunology* 142, 332-342.
- Bonaventura, P., Shekarian, T., Alcazer, V., Valladeau-Guilemond, J., Valsesia-Wittmann, S., Amigorena, S., Caux, C., and Depil, S. (2019). Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 10, 168.
- Borges, V.F., and Schedin, P.J. (2012). Pregnancy-associated breast cancer: an entity needing refinement of the definition. *Cancer* 118, 3226-3228.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z., and Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in biochemical sciences* 29, 233-242.
- Brinton, L.T., Sloane, H.S., Kester, M., and Kelly, K.A. (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 659-671.
- Brown, S., Hutchinson, C.V., Aspinall-O'Dea, M., Whetton, A.D., Johnson, S.M., Rees-Unwin, K., and Burthem, J. (2014). Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal

maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein. *European journal of haematology* *93*, 96-102.

- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., *et al.* (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer cell* *26*, 938.
- Bu, N., Wu, H., Sun, B., Zhang, G., Zhan, S., Zhang, R., and Zhou, L. (2011). Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with glioma. *Journal of neuro-oncology* *104*, 659-667.
- Budnik, V., Ruiz-Canada, C., and Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* *17*, 160-172.
- Burkard, T., Moser, M., Rauch, M., Jick, S.S., and Meier, C.R. (2019). Utilization pattern of hormone therapy in UK general practice between 1996 and 2015: a descriptive study. *Menopause* *26*, 741-749.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* *13*, 1-27.
- Buschow, S.I., Liefhebber, J.M., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2005). Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood cells, molecules & diseases* *35*, 398-403.
- Butt, Z., Haider, S.F., Arif, S., Khan, M.R., Ashfaq, U., Shahbaz, U., and Bukhari, M.H. (2012). Breast cancer risk factors: a comparison between pre-menopausal and post-menopausal women. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association* *62*, 120-124.
- Byersdorfer, C.A. (2014). The role of Fatty Acid oxidation in the metabolic reprogramming of activated t-cells. *Frontiers in immunology* *5*, 641.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer* *11*, 85-95.
- Campanelli, A.P., Roselino, A.M., Cavassani, K.A., Pereira, M.S., Mortara, R.A., Brodskyn, C.I., Goncalves, H.S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., *et al.* (2006). CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* *193*, 1313-1322.
- Cangussu, S.D., Souza, C.C., Campos, C.F., Vieira, L.Q., Afonso, L.C., and Arantes, R.M. (2009). Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* *104*, 918-922.
- Carroll, K.C., Viollet, B., and Suttles, J. (2013). AMPK α 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling. *Journal of leukocyte biology* *94*, 1113-1121.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *72*, 3666-3670.
- Cecil, D.L., Holt, G.E., Park, K.H., Gad, E., Rastetter, L., Childs, J., Higgins, D., and Disis, M.L. (2014). Elimination of IL-10-inducing T-helper epitopes from an IGFBP-2 vaccine ensures potent antitumor activity. *Cancer research* *74*, 2710-2718.

- Chamcheu, J.C., Roy, T., Uddin, M.B., Banang-Mbeumi, S., Chamcheu, R.N., Walker, A.L., Liu, Y.Y., and Huang, S. (2019). Role and Therapeutic Targeting of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Skin Cancer: A Review of Current Status and Future Trends on Natural and Synthetic Agents Therapy. *Cells* 8.
- Chan, M., Liaw, C.S., Ji, S.M., Tan, H.H., Wong, C.Y., Thike, A.A., Tan, P.H., Ho, G.H., and Lee, A.S. (2013). Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 4477-4487.
- Chang, W.J., Du, Y., Zhao, X., Ma, L.Y., and Cao, G.W. (2014). Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World journal of gastroenterology* 20, 4586-4596.
- Charych, D.H., Hoch, U., Langowski, J.L., Lee, S.R., Addepalli, M.K., Kirk, P.B., Sheng, D., Liu, X., Sims, P.W., VanderVeen, L.A., *et al.* (2016). NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 680-690.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., and Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 237-249.
- Cheang, M.C., Martin, M., Nielsen, T.O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., Ruiz, A., Chia, S., Shepherd, L., Ruiz-Borrego, M., *et al.* (2015). Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The oncologist* 20, 474-482.
- Chen, G., Huang, A.C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., *et al.* (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560, 382-386.
- Cheng, M., Hu, S., Wang, Z., Pei, Y., Fan, R., Liu, X., Wang, L., Zhou, J., Zheng, S., Zhang, T., *et al.* (2016). Inhibition of neddylation regulates dendritic cell functions via Deptor accumulation driven mTOR inactivation. *Oncotarget* 7, 35643-35654.
- Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J.V., Colgan, J.D., *et al.* (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nature immunology* 13, 832-842.
- Chie, W.C., Hsieh, C., Newcomb, P.A., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R., Clapp, R.W., Burke, K.P., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., *et al.* (2000). Age at any full-term pregnancy and breast cancer risk. *American journal of epidemiology* 151, 715-722.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.
- Chou, H.Y., Howng, S.L., Cheng, T.S., Hsiao, Y.L., Lieu, A.S., Loh, J.K., Hwang, S.L., Lin, C.C., Hsu, C.M., Wang, C., *et al.* (2006). GSKIP is homologous to the Axin GSK3beta interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3beta. *Biochemistry* 45, 11379-11389.
- Chu, B., Wu, T., Miao, L., Mei, Y., and Wu, M. (2015). MiR-181a regulates lipid metabolism via IDH1. *Scientific reports* 5, 8801.
- Chua, M.L.K., Wee, J.T.S., Hui, E.P., and Chan, A.T.C. (2016). Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 387, 1012-1024.

- Clark, R.A. (2018). Resident memory T cells: Runx and hide. *Science immunology* 3.
- Cobbold, S.P., Adams, E., Farquhar, C.A., Nolan, K.F., Howie, D., Lui, K.O., Fairchild, P.J., Mellor, A.L., Ron, D., and Waldmann, H. (2009). Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12055-12060.
- Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 769-776.
- Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery* 14, 199-220.
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., and Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science* 126, 5553-5565.
- Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 255-289.
- Conlon, K.C., Miljkovic, M.D., and Waldmann, T.A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 39, 6-21.
- Cooks, T., Pateras, I.S., Jenkins, L.M., Patel, K.M., Robles, A.I., Morris, J., Forshew, T., Appella, E., Gorgoulis, V.G., and Harris, C.C. (2018). Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nature communications* 9, 771.
- Cornu, M., Albert, V., and Hall, M.N. (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current opinion in genetics & development* 23, 53-62.
- Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G., and Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of immunological methods* 174, 231-235.
- Corraliza, I.M., Soler, G., Eichmann, K., and Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 206, 667-673.
- Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T.R., Leonardi, T., Alpi, E., Drago, D., Alfaro-Cervello, C., Saini, H.K., Davis, M.P., Schaeffer, J., *et al.* (2014). Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Molecular cell* 56, 193-204.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Cruz, F.M., Colbert, J.D., Merino, E., Kriegsman, B.A., and Rock, K.L. (2017). The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annual review of immunology* 35, 149-176.
- Cuk, K., Zucknick, M., Madhavan, D., Schott, S., Golatta, M., Heil, J., Marme, F., Turchinovich, A., Sinn, P., Sohn, C., *et al.* (2013). Plasma microRNA panel for minimally invasive detection of breast cancer. *PLoS one* 8, e76729.
- Cullen, S.P., Brunet, M., and Martin, S.J. (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell death and differentiation* 17, 616-623.

- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., *et al.* (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature medicine* 9, 562-567.
- Czernek, L., Chworos, A., and Duechler, M. (2015). The Uptake of Extracellular Vesicles is Affected by the Differentiation Status of Myeloid Cells. *Scandinavian journal of immunology* 82, 506-514.
- Czernek, L., and Duchler, M. (2017). Functions of Cancer-Derived Extracellular Vesicles in Immunosuppression. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 65, 311-323.
- de Couto, G., Gallet, R., Cambier, L., Jaghatspanyan, E., Makkar, N., Dawkins, J.F., Berman, B.P., and Marban, E. (2017). Exosomal MicroRNA Transfer Into Macrophages Mediates Cellular Postconditioning. *Circulation* 136, 200-214.
- de Groot, R.P., Auwerx, J., Bourouis, M., and Sassone-Corsi, P. (1993). Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy. *Oncogene* 8, 841-847.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34, 2480-2488.
- de Lima Thomaz, L., Peron, G., Oliveira, J., da Rosa, L.C., Thome, R., and Verinaud, L. (2018). The impact of metabolic reprogramming on dendritic cell function. *International immunopharmacology* 63, 84-93.
- de Necochea-Campion, R., Gonda, A., Kabagwira, J., Mirshahidi, S., Cao, H., Reeves, M.E., and Wall, N.R. (2018). A practical approach to extracellular vesicle characterization among similar biological samples. *Biomedical Physics & Engineering Express* 4, 065013.
- De Serres, S.A., Sayegh, M.H., and Najafian, N. (2009). Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation! *Clin J Am Soc Nephrol* 4, 1661-1669.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoyji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1257-1265.
- Deak, V.A., Skroblin, P., Dittmayer, C., Knobloch, K.P., Bachmann, S., and Klussmann, E. (2016). The A-kinase Anchoring Protein GSKIP Regulates GSK3beta Activity and Controls Palatal Shelf Fusion in Mice. *The Journal of biological chemistry* 291, 681-690.
- Della Bella, S., Gennaro, M., Vaccari, M., Ferraris, C., Nicola, S., Riva, A., Clerici, M., Greco, M., and Villa, M.L. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *British journal of cancer* 89, 1463-1472.
- Dema, A., Schroter, M.F., Perets, E., Skroblin, P., Moutty, M.C., Deak, V.A., Birchmeier, W., and Klussmann, E. (2016). The A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Glycogen Synthase Kinase 3beta Interaction Protein (GSKIP) Regulates beta-Catenin through Its Interactions with Both Protein Kinase A (PKA) and GSK3beta. *The Journal of biological chemistry* 291, 19618-19630.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Sandy, P., and Schneider, C. (2003). Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *The Journal of biological chemistry* 278, 39583-39590.
- Di Caro, G., Cortese, N., Castino, G.F., Grizzi, F., Gavazzi, F., Ridolfi, C., Capretti, G., Mineri, R., Todoric, J., Zerbi, A., *et al.* (2016). Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy. *Gut* 65, 1710-1720.

- Ding, G., Zhou, L., Qian, Y., Fu, M., Chen, J., Chen, J., Xiang, J., Wu, Z., Jiang, G., and Cao, L. (2015). Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget* 6, 29877-29888.
- Dionisi, M., De Archangelis, C., Battisti, F., Rahimi Koshkaki, H., Belleudi, F., Zizzari, I.G., Ruscito, I., Albano, C., Di Filippo, A., Torrisci, M.R., *et al.* (2018). Tumor-Derived Microvesicles Enhance Cross-Processing Ability of Clinical Grade Dendritic Cells. *Frontiers in immunology* 9, 2481.
- Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* 116, 1175-1186.
- Dominguez, C., David, J.M., and Palena, C. (2017). Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Seminars in cancer biology* 47, 177-184.
- Domogalla, M.P., Rostan, P.V., Raker, V.K., and Steinbrink, K. (2017). Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Frontiers in immunology* 8, 1764.
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W., Harris, A.L., Dobson, P.J., *et al.* (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7, 780-788.
- Drake, C.G., Jaffee, E., and Pardoll, D.M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology* 90, 51-81.
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 4, 11-22.
- Dueck, A., Eichner, A., Sixt, M., and Meister, G. (2014). A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. *FEBS letters* 588, 632-640.
- Dumitriu, I.E., Dunbar, D.R., Howie, S.E., Sethi, T., and Gregory, C.D. (2009). Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 182, 2795-2807.
- Dustin, M.L. (2014). The immunological synapse. *Cancer immunology research* 2, 1023-1033.
- Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 315, 1650-1659.
- Edechi, C.A., Ikeogu, N., Uzonna, J.E., and Myal, Y. (2019). Regulation of Immunity in Breast Cancer. *Cancers* 11.
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *European Journal of Inorganic Chemistry* 42, 17-47.
- Eichmuller, S.B., Osen, W., Mandelboim, O., and Seliger, B. (2017). Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape. *Journal of the National Cancer Institute* 109.
- Embi, N., Rylatt, D.B., and Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107, 519-527.
- Esquivel-Velazquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M.I., Nava-Castro, K.E., Castro, J.I., and Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35, 1-16.

- Everts, B., Amiel, E., Huang, S.C., Smith, A.M., Chang, C.H., Lam, W.Y., Redmann, V., Freitas, T.C., Blagih, J., van der Windt, G.J., *et al.* (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKvarepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature immunology* *15*, 323-332.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G.J., *et al.* (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E2110-2116.
- Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Jr., Woodgett, J.R., and Mills, G.B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 11960-11965.
- Fares, C.M., Van Allen, E.M., Drake, C.G., Allison, J.P., and Hu-Lieskovan, S. (2019). Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade: Why Does Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Not Work for All Patients? *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting* *39*, 147-164.
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., and Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International journal of cancer* *121*, 2381-2386.
- Fillon, M. (2018). Changes in inflammation and insulin pathways mediate the association between resistance training and breast cancer survival. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Fleming, V., Hu, X., Weber, R., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2018). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Frontiers in immunology* *9*, 398.
- Floercken, A., Kopp, J., van Lessen, A., Movassaghi, K., Takvorian, A., Johrens, K., Mobs, M., Schonemann, C., Sawitzki, B., Egerer, K., *et al.* (2013). Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study. *Hum Vaccin Immunother* *9*, 1217-1227.
- Frame, S., Cohen, P., and Biondi, R.M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell* *7*, 1321-1327.
- Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* *12*, 298-306.
- Friend, C., Marovitz, W., Henle, G., Henle, W., Tsuei, D., Hirschhorn, K., Holland, J., and Cuttner, J. (1978). Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer research* *38*, 2581-2591.
- Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2019). Development of immune checkpoint therapy for cancer. *The Journal of experimental medicine* *216*, 1244-1254.
- Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *208*, 2005-2016.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews Immunology* *4*, 941-952.
- Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer immunology research* *5*, 3-8.

- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology* 9, 162-174.
- Gabrusiewicz, K., Li, X., Wei, J., Hashimoto, Y., Marisetty, A.L., Ott, M., Wang, F., Hawke, D., Yu, J., Healy, L.M., *et al.* (2018). Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncoimmunology* 7, e1412909.
- Galon, J., Fridman, W.H., and Pages, F. (2007). The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer research* 67, 1883-1886.
- Gandellini, P., Andriani, F., Merlino, G., D'Aiuto, F., Roz, L., and Callari, M. (2015). Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression patterns identify both common and unique features of tumour-stroma crosstalk across cancer types. *Seminars in cancer biology* 35, 96-106.
- Garcia, D.M., Baek, D., Shin, C., Bell, G.W., Grimson, A., and Bartel, D.P. (2011). Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1139-1146.
- Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in immunology* 37, 855-865.
- Gatti-Mays, M.E., Balko, J.M., Gameiro, S.R., Bear, H.D., Prabhakaran, S., Fukui, J., Disis, M.L., Nanda, R., Gulley, J.L., Kalinsky, K., *et al.* (2019). If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ breast cancer* 5, 37.
- Ghorbani, S., Talebi, F., Chan, W.F., Masoumi, F., Vojgani, M., Power, C., and Noorbakhsh, F. (2017). MicroRNA-181 Variants Regulate T Cell Phenotype in the Context of Autoimmune Neuroinflammation. *Frontiers in immunology* 8, 758.
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C.B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavik, J., Machala, M., and Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature communications* 5, 3477.
- Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology* 17, e542-e551.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 5, 953-964.
- Gough, D.J., Levy, D.E., Johnstone, R.W., and Clarke, C.J. (2008). IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine & growth factor reviews* 19, 383-394.
- Gould, S.J., and Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 2.
- Granelli-Piperno, A., Pope, M., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1995). Coexpression of NF-kappa B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10944-10948.
- Greaves, M. (2015). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer discovery* 5, 806-820.
- Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.
- Gregori, S., Goudy, K.S., and Roncarolo, M.G. (2012). The cellular and molecular mechanisms of immunosuppression by human type 1 regulatory T cells. *Frontiers in immunology* 3, 30.

- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883-899.
- Grotzke, J.E., Sengupta, D., Lu, Q., and Cresswell, P. (2017). The ongoing saga of the mechanism(s) of MHC class I-restricted cross-presentation. *Current opinion in immunology* *46*, 89-96.
- Gu, X., Erb, U., Buchler, M.W., and Zoller, M. (2015). Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *International journal of cancer* *136*, E74-84.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews Immunology* *14*, 571-578.
- Gungor, N., Godschalk, R.W., Pachen, D.M., Van Schooten, F.J., and Knaapen, A.M. (2007). Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *21*, 2359-2367.
- Gurunathan, S., Kang, M.H., Jeyaraj, M., Qasim, M., and Kim, J.H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* *8*.
- Haderk, F., Schulz, R., Iskar, M., Cid, L.L., Worst, T., Willmund, K.V., Schulz, A., Warnken, U., Seiler, J., Benner, A., *et al.* (2017). Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Science immunology* *2*.
- Haidinger, M., Poglitsch, M., Geyeregger, R., Kasturi, S., Zeyda, M., Zlabinger, G.J., Pulendran, B., Horl, W.H., Saemann, M.D., and Weichhart, T. (2010). A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *Journal of immunology* *185*, 3919-3931.
- Ham, S., Lima, L.G., Chai, E.P.Z., Muller, A., Lobb, R.J., Krumeich, S., Wen, S.W., Wiegmanns, A.P., and Moller, A. (2018). Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via gp130/STAT3 Signaling. *Frontiers in immunology* *9*, 871.
- Han, G., Chen, G., Shen, B., and Li, Y. (2013). Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells. *Frontiers in immunology* *4*, 449.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hansen, G.L., Gaudernack, G., Brunsvig, P.F., Cvancarova, M., and Kyte, J.A. (2015). Immunological factors influencing clinical outcome in lung cancer patients after telomerase peptide vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *64*, 1609-1621.
- Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., and Force, T. (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4610-4615.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., and Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* *5*, 66.
- Harding, C.V., Heuser, J.E., and Stahl, P.D. (2013). Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol* *200*, 367-371.

- Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., and Takahashi, H. (2013). Inactivation of tumor-specific CD8(+) CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and cell biology* 91, 545-555.
- Hata, Y., Slaughter, C.A., and Sudhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.
- Hazan-Halevy, I., Rosenblum, D., Weinstein, S., Bairey, O., Raanani, P., and Peer, D. (2015). Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer letters* 364, 59-69.
- Heneghan, H.M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J., and Kerin, M.J. (2010). Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The oncologist* 15, 673-682.
- Heo, T.H., Wahler, J., and Suh, N. (2016). Potential therapeutic implications of IL-6/IL-6R/gp130-targeting agents in breast cancer. *Oncotarget* 7, 15460-15473.
- Hernandez, A., Burger, M., Blomberg, B.B., Ross, W.A., Gaynor, J.J., Lindner, I., Cirocco, R., Mathew, J.M., Carreno, M., and Jin, Y. (2007). Inhibition of NF- κ B during human dendritic cell differentiation generates energy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches. *Human immunology* 68, 715-729.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.
- Hong, C.S., Sharma, P., Yerneni, S.S., Simms, P., Jackson, E.K., Whiteside, T.L., and Boyiadzis, M. (2017). Circulating exosomes carrying an immunosuppressive cargo interfere with cellular immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Scientific reports* 7, 14684.
- Hornick, N.I., Doron, B., Abdelhamed, S., Huan, J., Harrington, C.A., Shen, R., Cambronne, X.A., Chakkaramakkil Verghese, S., and Kurre, P. (2016). AML suppresses hematopoiesis by releasing exosomes that contain microRNAs targeting c-MYB. *Science signaling* 9, ra88.
- Hoves, S., Sutton, V.R., and Trapani, J.A. (2012). A novel role for granzymes in anti-tumor immunity. *Oncoimmunology* 1, 219-221.
- Hsu, Y.L., Hung, J.Y., Chang, W.A., Jian, S.F., Lin, Y.S., Pan, Y.C., Wu, C.Y., and Kuo, P.L. (2018). Hypoxic Lung-Cancer-Derived Extracellular Vesicle MicroRNA-103a Increases the Oncogenic Effects of Macrophages by Targeting PTEN. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 568-581.
- Hu, X., Paik, P.K., Chen, J., Yamilina, A., Kockeritz, L., Lu, T.T., Woodgett, J.R., and Ivashkiv, L.B. (2006). IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24, 563-574.
- Huang, G., Wang, Y., Vogel, P., Kanneganti, T.D., Otsu, K., and Chi, H. (2012). Signaling via the kinase p38alpha programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. *Nature immunology* 13, 152-161.
- Huang, J., Yu, S., Ji, C., and Li, J. (2015). Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20, 210-215.

- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, M., *et al.* (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics* *14*, 319.
- Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., *et al.* (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* *128*, 1796-1804.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in immunology* *4*, 82.
- Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J.M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* *20*, 22-27.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S.E., Totty, N.F., and Woodgett, J.R. (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* *12*, 803-808.
- Hundsrucker, C., Skroblin, P., Christian, F., Zenn, H.-M., Popara, V., Joshi, M., Eichhorst, J., Wiesner, B., Herberg, F.W., and Reif, B. (2010a). Glycogen synthase kinase 3 β interaction protein functions as an A-kinase anchoring protein. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 5507-5521.
- Hundsrucker, C., Skroblin, P., Christian, F., Zenn, H.M., Popara, V., Joshi, M., Eichhorst, J., Wiesner, B., Herberg, F.W., Reif, B., *et al.* (2010b). Glycogen synthase kinase 3beta interaction protein functions as an A-kinase anchoring protein. *The Journal of biological chemistry* *285*, 5507-5521.
- Hurley, J.H. (2015). ESCRTs are everywhere. *The EMBO journal* *34*, 2398-2407.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature reviews Cancer* *3*, 276-285.
- Jeffery, H.C., Braitch, M.K., Brown, S., and Oo, Y.H. (2016). Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives. *Frontiers in immunology* *7*, 334.
- Jess, T., Simonsen, J., Jorgensen, K.T., Pedersen, B.V., Nielsen, N.M., and Frisch, M. (2012). Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology* *143*, 375-381 e371; quiz e313-374.
- Jewell, J.L., Russell, R.C., and Guan, K.L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 133-139.
- Jochems, C., and Schlom, J. (2011). Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Experimental biology and medicine* *236*, 567-579.
- Johnson, D.J., and Ohashi, P.S. (2013). Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1284*, 46-51.
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry* *262*, 9412-9420.
- Jones, S.A., and Jenkins, B.J. (2018). Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature reviews Immunology* *18*, 773-789.
- Jope, R.S., and Johnson, G.V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences* *29*, 95-102.

- Jope, R.S., and Roh, M.S. (2006). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Current drug targets* 7, 1421-1434.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., and Beurel, E. (2007). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32, 577-595.
- Kahlert, C., Melo, S.A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., *et al.* (2014). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of biological chemistry* 289, 3869-3875.
- Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 723-733.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation* 126, 1208-1215.
- Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., *et al.* (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423-1427.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Karthaus, N., Torensma, R., and Tel, J. (2012). Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *The American journal of pathology* 181, 733-742.
- Karyampudi, L., Lamichhane, P., Scheid, A.D., Kalli, K.R., Shreeder, B., Krempski, J.W., Behrens, M.D., and Knutson, K.L. (2014). Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer research* 74, 2974-2985.
- Katsuya, Y., Horinouchi, H., Asao, T., Kitahara, S., Goto, Y., Kanda, S., Fujiwara, Y., Nokihara, H., Yamamoto, N., Watanabe, S., *et al.* (2016). Expression of programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in thymic epithelial tumors: Impact on treatment efficacy and alteration in expression after chemotherapy. *Lung cancer* 99, 4-10.
- Kawaguchi, K., Sakurai, M., Yamamoto, Y., Suzuki, E., Tsuda, M., Kataoka, T.R., Hirata, M., Nishie, M., Nojiri, T., Kumazoe, M., *et al.* (2019). Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Scientific reports* 9, 2924.
- Kazi, A., Xiang, S., Yang, H., Delitto, D., Trevino, J., Jiang, R.H.Y., Ayaz, M., Lawrence, H.R., Kennedy, P., and Sebti, S.M. (2018). GSK3 suppression upregulates beta-catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumors. *Nature communications* 9, 5154.
- Kelly, B., and O'Neill, L.A. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell research* 25, 771-784.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Kiertscher, S.M., Luo, J., Dubinett, S.M., and Roth, M.D. (2000). Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology* 164, 1269-1276.
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.

- Kobayashi, T., Matsuoka, K., Sheikh, S.Z., Elloumi, H.Z., Kamada, N., Hisamatsu, T., Hansen, J.J., Doty, K.R., Pope, S.D., Smale, S.T., *et al.* (2011). NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *Journal of immunology* *186*, 4649-4655.
- Kockeritz, L., Doble, B., Patel, S., and Woodgett, J.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Current drug targets* *7*, 1377-1388.
- Kodahl, A.R., Lyng, M.B., Binder, H., Cold, S., Gravgaard, K., Knoop, A.S., and Ditzel, H.J. (2014). Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Molecular oncology* *8*, 874-883.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* *450*, 903-907.
- Koehne, C.H., and Dubois, R.N. (2004). COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* *31*, 12-21.
- Kogure, T., Yan, I.K., Lin, W.L., and Patel, T. (2013). Extracellular Vesicle-Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339: A Mechanism of Intercellular Signaling in Human Hepatocellular Cancer. *Genes & cancer* *4*, 261-272.
- Konig, L., Kasimir-Bauer, S., Bittner, A.K., Hoffmann, O., Wagner, B., Santos Manvailer, L.F., Kimmig, R., Horn, P.A., and Rebmann, V. (2017). Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* *7*, e1376153.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Thery, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *113*, E968-977.
- Kratchmarov, R., Viragova, S., Kim, M.J., Rothman, N.J., Liu, K., Reizis, B., and Reiner, S.L. (2018). Metabolic control of cell fate bifurcations in a hematopoietic progenitor population. *Immunology and cell biology* *96*, 863-871.
- Krawczyk, C.M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R.J., Cross, J.R., Jung, E., Thompson, C.B., Jones, R.G., *et al.* (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* *115*, 4742-4749.
- Krempsi, J., Karyampudi, L., Behrens, M.D., Erskine, C.L., Hartmann, L., Dong, H., Goode, E.L., Kalli, K.R., and Knutson, K.L. (2011). Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *Journal of immunology* *186*, 6905-6913.
- Kropf, P., Fuentes, J.M., Fahrlich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M., and Muller, I. (2005). Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *19*, 1000-1002.
- Kryczanowsky, F., Raker, V., Graulich, E., Domogalla, M.P., and Steinbrink, K. (2016). IL-10-Modulated Human Dendritic Cells for Clinical Use: Identification of a Stable and Migratory Subset with Improved Tolerogenic Activity. *Journal of immunology* *197*, 3607-3617.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal* *420*, 1-16.

- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D.I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology* 37, 208-220.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., and Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* 172, 989-999.
- Laberge, A., Arif, S., and Moulin, V.J. (2018). Microvesicles: Intercellular messengers in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 233, 5550-5563.
- Langlands, F.E., Horgan, K., Dodwell, D.D., and Smith, L. (2013). Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *The British journal of radiology* 86, 20120601.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Lasser, C., Alikhani, V.S., Ekstrom, K., Eldh, M., Paredes, P.T., Bossios, A., Sjostrand, M., Gabriellsson, S., Lotvall, J., and Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine* 9, 9.
- Lasser, C., Eldh, M., and Lotvall, J. (2012). Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3037.
- Li, M., Wang, X., Meintzer, M.K., Laessig, T., Birnbaum, M.J., and Heidenreich, K.A. (2000). Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology* 20, 9356-9363.
- Li, Q., Guo, Z., Xu, X., Xia, S., and Cao, X. (2008). Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. *European journal of immunology* 38, 2751-2761.
- Lim, J., Choi, M., Lee, H., Kim, Y.H., Han, J.Y., Lee, E.S., and Cho, Y. (2019). Direct isolation and characterization of circulating exosomes from biological samples using magnetic nanowires. *Journal of nanobiotechnology* 17, 1.
- Lima, H.C., and Titus, R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 64, 5442-5445.
- Limagne, E., Euvrard, R., Thibaudin, M., Rebe, C., Derangere, V., Chevriaux, A., Boidot, R., Vegran, F., Bonnefoy, N., Vincent, J., *et al.* (2016). Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer research* 76, 5241-5252.
- Linding, R., Jensen, L.J., Ostheimer, G.J., van Vugt, M.A., Jorgensen, C., Miron, I.M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., *et al.* (2007). Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415-1426.
- Linsley, P.S., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5031-5035.
- Liu, H., Chen, L., Peng, Y., Yu, S., Liu, J., Wu, L., Zhang, L., Wu, Q., Chang, X., Yu, X., *et al.* (2018). Dendritic cells loaded with tumor derived exosomes for cancer immunotherapy. *Oncotarget* 9, 2887-2894.
- Liu, K.J., Arron, J.R., Stankunas, K., Crabtree, G.R., and Longaker, M.T. (2007). Chemical rescue of cleft palate and midline defects in conditional GSK-3beta mice. *Nature* 446, 79-82.

- Liu, Q., Zhang, C., Sun, A., Zheng, Y., Wang, L., and Cao, X. (2009). Tumor-educated CD11b^{high}Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *Journal of immunology* 182, 6207-6216.
- Liu, S., Yu, S., Hasegawa, Y., Lapushin, R., Xu, H.J., Woodgett, J.R., Mills, G.B., and Fang, X. (2004). Glycogen synthase kinase 3 β is a negative regulator of growth factor-induced activation of the c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* 279, 51075-51081.
- Liu, Y., and Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer cell* 30, 668-681.
- Loftus, T.J., Mohr, A.M., and Moldawer, L.L. (2018). Dysregulated myelopoiesis and hematopoietic function following acute physiologic insult. *Curr Opin Hematol* 25, 37-43.
- Lopes, A.M.M., Michelin, M.A., and Murta, E.F.C. (2017). Monocyte-derived dendritic cells from patients with cervical intraepithelial lesions. *Oncology letters* 13, 1456-1462.
- Lopez Kostka, S., Dinges, S., Griewank, K., Iwakura, Y., Udey, M.C., and von Stebut, E. (2009). IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *Journal of immunology* 182, 3039-3046.
- Luo, J. (2009). Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer letters* 273, 194-200.
- Luo, L., Wall, A.A., Yeo, J.C., Condon, N.D., Norwood, S.J., Schoenwaelder, S., Chen, K.W., Jackson, S., Jenkins, B.J., Hartland, E.L., *et al.* (2014). Rab8a interacts directly with PI3K γ to modulate TLR4-driven PI3K and mTOR signalling. *Nature communications* 5, 4407.
- Lyons, A.B., and Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 171, 131-137.
- Ma, Y., Shurin, G.V., Peiyuan, Z., and Shurin, M.R. (2013). Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer* 4, 36-44.
- Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical medicine insights Pathology* 8, 23-31.
- Malinarich, F., Duan, K., Hamid, R.A., Bijin, A., Lin, W.X., Poidinger, M., Fairhurst, A.M., and Connolly, J.E. (2015). High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells. *Journal of immunology* 194, 5174-5186.
- Mangolini, A., Ferracin, M., Zanzi, M.V., Saccanti, E., Ebnaof, S.O., Poma, V.V., Sanz, J.M., Passaro, A., Pedriali, M., Frassoldati, A., *et al.* (2015). Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res* 3, 12.
- Mani, A., Roda, J., Young, D., Caligiuri, M.A., Fleming, G.F., Kaufman, P., Brufsky, A., Ottman, S., Carson, W.E., 3rd, and Shapiro, C.L. (2009). A phase II trial of trastuzumab in combination with low-dose interleukin-2 (IL-2) in patients (PTS) with metastatic breast cancer (MBC) who have previously failed trastuzumab. *Breast cancer research and treatment* 117, 83-89.
- Manikwar, P., Kiptoo, P., Badawi, A.H., Buyuktimkin, B., and Siahaan, T.J. (2012). Antigen-specific blocking of CD4-specific immunological synapse formation using BPI and current therapies for autoimmune diseases. *Medicinal research reviews* 32, 727-764.

- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1061-1067.
- Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. (2003). Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155-167.
- Martin, M., Rehani, K., Joep, R.S., and Michalek, S.M. (2005a). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology* 6, 777-784.
- Martin, M., Rehani, K., Joep, R.S., and Michalek, S.M. (2005b). Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology* 6, 777-784.
- Martini, M., Testi, M.G., Pasetto, M., Picchio, M.C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P., *et al.* (2010). IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 28, 3548-3557.
- Matamala, N., Vargas, M.T., Gonzalez-Campora, R., Minambres, R., Arias, J.I., Menendez, P., Andres-Leon, E., Gomez-Lopez, G., Yanowsky, K., Calvete-Candenas, J., *et al.* (2015). Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clinical chemistry* 61, 1098-1106.
- Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.S., Shea, L.K., *et al.* (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting. *Nature* 482, 400-404.
- McClure, C., Brudecki, L., Ferguson, D.A., Yao, Z.Q., Moorman, J.P., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2014). MicroRNA 21 (miR-21) and miR-181b couple with NFI-A to generate myeloid-derived suppressor cells and promote immunosuppression in late sepsis. *Infection and immunity* 82, 3816-3825.
- McDonald, O.G., Li, X., Saunders, T., Tryggvadottir, R., Mentch, S.J., Warmoes, M.O., Word, A.E., Carrer, A., Salz, T.H., Natsume, S., *et al.* (2017). Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis. *Nature genetics* 49, 367-376.
- McElrath, M.J., Kaplan, G., Nusrat, A., and Cohn, Z.A. (1987). Cutaneous leishmaniasis. The defect in T cell influx in BALB/c mice. *The Journal of experimental medicine* 165, 546-559.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meirou, Y., Kanterman, J., and Baniyash, M. (2015). Paving the Road to Tumor Development and Spreading: Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Frontiers in immunology* 6, 523.
- Mellman, I. (2013). Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer immunology research* 1, 145-149.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2008). Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nature Reviews Immunology* 8, 74-80.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 31, 563-604.

- Michielsen, A.J., Hogan, A.E., Marry, J., Tosetto, M., Cox, F., Hyland, J.M., Sheahan, K.D., O'Donoghue, D.P., Mulcahy, H.E., Ryan, E.J., *et al.* (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PloS one* 6, e27944.
- Min, S., Liang, X., Zhang, M., Zhang, Y., Mei, S., Liu, J., Liu, J., Su, X., Cao, S., Zhong, X., *et al.* (2013). Multiple tumor-associated microRNAs modulate the survival and longevity of dendritic cells by targeting YWHAZ and Bcl2 signaling pathways. *Journal of immunology* 190, 2437-2446.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* 27, 16-25.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2, 282.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European journal of immunology* 25, 1101-1104.
- Mojic, M., Takeda, K., and Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN-gamma: Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *International journal of molecular sciences* 19.
- Montagnoli, C., Bacci, A., Bozza, S., Gaziano, R., Mosci, P., Sharpe, A.H., and Romani, L. (2002). B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *Journal of immunology* 169, 6298-6308.
- Muller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W., and Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190, 73-76.
- Muller, L., Mitsuhashi, M., Simms, P., Gooding, W.E., and Whiteside, T.L. (2016). Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Scientific reports* 6, 20254.
- Muller, L., Simms, P., Hong, C.S., Nishimura, M.I., Jackson, E.K., Watkins, S.C., and Whiteside, T.L. (2017). Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms. *Oncoimmunology* 6, e1261243.
- Munder, M., Eichmann, K., Moran, J.M., Centeno, F., Soler, G., and Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of immunology* 163, 3771-3777.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R., *et al.* (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-1870.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current biology : CB* 19, 1875-1885.
- Naing, A., Papadopoulos, K.P., Autio, K.A., Ott, P.A., Patel, M.R., Wong, D.J., Falchook, G.S., Pant, S., Whiteside, M., Rasco, D.R., *et al.* (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated

Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34, 3562-3569.

- Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., and Moroi, Y. (2004). Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International immunology* 16, 1701-1709.
- Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., and Ju, J. (2006). Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 3, 317-324.
- Nicolini, A., Carpi, A., and Rossi, G. (2007). Relationship of cellular immunity, cytokines and CRP with clinical course in breast cancer patients with endocrine-dependent distant metastases treated with immunotherapy. *Cancer letters* 251, 330-338.
- Nolte-t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H., and t Hoen, P.A. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic acids research* 40, 9272-9285.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Oft, M. (2014). IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer immunology research* 2, 194-199.
- Okoye, I.S., Coomes, S.M., Pelly, V.S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M.C., and Wilson, M.S. (2014). MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* 41, 89-103.
- Ono, T., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., Nonomura, K., and Onoe, K. (2007). Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. *Immunology* 122, 189-198.
- Orsini, G., Legitimo, A., Failli, A., Ferrari, P., Nicolini, A., Spisni, R., Miccoli, P., and Consolini, R. (2013). Defective generation and maturation of dendritic cells from monocytes in colorectal cancer patients during the course of disease. *International journal of molecular sciences* 14, 22022-22041.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* 182, 4499-4506.
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P.J., and Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in immunology* 36, 229-239.
- Palomo, V., and Martinez, A. (2017). Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors: a patent update (2014-2015). *Expert opinion on therapeutic patents* 27, 657-666.
- Palucka, A.K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J.P., Johnston, D.A., Fay, J., and Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *Journal of immunotherapy* 29, 545-557.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 12, 252-264.
- Parker, B.S., Rautela, J., and Hertzog, P.J. (2016). Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 16, 131-144.

- Patel, S., and Woodgett, J. (2008). Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop? *Cancer cell* *14*, 351-353.
- Pearce, E.J., and Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nature reviews Immunology* *15*, 18-29.
- Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Seminars in cancer biology* *21*, 139-146.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., *et al.* (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature reviews Cancer* *17*, 302-317.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747-752.
- Perrot, I., Blanchard, D., Freymond, N., Isaac, S., Guibert, B., Pacheco, Y., and Lebecque, S. (2007). Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *Journal of immunology* *178*, 2763-2769.
- Pfeffer, S.R. (2013). A prize for membrane magic. *Cell* *155*, 1203-1206.
- Piao, Y.J., Kim, H.S., Hwang, E.H., Woo, J., Zhang, M., and Moon, W.K. (2018). Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis. *Oncotarget* *9*, 7398-7410.
- Pinzon-Charry, A., Ho, C.S., Maxwell, T., McGuckin, M.A., Schmidt, C., Furnival, C., Pyke, C.M., and Lopez, J.A. (2007). Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *British journal of cancer* *97*, 1251-1259.
- Poggio, M., Hu, T., Pai, C.C., Chu, B., Belair, C.D., Chang, A., Montabana, E., Lang, U.E., Fu, Q., Fong, L., *et al.* (2019). Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* *177*, 414-427 e413.
- Pon, J.R., and Marra, M.A. (2015). Driver and passenger mutations in cancer. *Annual review of pathology* *10*, 25-50.
- Preischl, E.E., Pendl, G.G., Elbe, A., Serfling, E., Harrer, N.E., Stingl, G., and Baumruker, T. (1996). Induction of the TNF-alpha promoter in the murine dendritic cell line 18 and the murine mast cell line CPII is differently regulated. *Journal of immunology* *157*, 2645-2653.
- Qian, C., and Cao, X. (2012). Naturally occurring CD1c⁺ human regulatory dendritic cells: immunoregulators that are expanded in response to E. coli infection. *European journal of immunology* *42*, 1388-1392.
- Qian, C., Qian, L., Yu, Y., An, H., Guo, Z., Han, Y., Chen, Y., Bai, Y., Wang, Q., and Cao, X. (2013). Fas signal promotes the immunosuppressive function of regulatory dendritic cells via the ERK/beta-catenin pathway. *The Journal of biological chemistry* *288*, 27825-27835.
- Quintayo, M.A., Munro, A.F., Thomas, J., Kunkler, I.H., Jack, W., Kerr, G.R., Dixon, J.M., Chetty, U., and Bartlett, J.M. (2012). GSK3beta and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* *136*, 161-168.
- Raker, V.K., Domogalla, M.P., and Steinbrink, K. (2015). Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Frontiers in immunology* *6*, 569.
- Ramos, R.N., Chin, L.S., Dos Santos, A.P., Bergami-Santos, P.C., Laginha, F., and Barbuto, J.A. (2012). Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Journal of leukocyte biology* *92*, 673-682.

- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine* 183, 1161-1172.
- Ratti, N., Shifrin, N., McCauley, S., Verma, R., Van Vlasselaer, P., Oft, M., and Leveque, J. (2018). 1180P Combination of pegilodecakin and docetaxel shows synergy in tumor rejection in immune resistant TNBC model. *Annals of Oncology* 29, mdy288. 053.
- Ray, A., Chakraborty, K., and Ray, P. (2013). Immunosuppressive MDSCs induced by TLR signaling during infection and role in resolution of inflammation. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 52.
- Reichardt, W., Durr, C., von Elverfeldt, D., Juttner, E., Gerlach, U.V., Yamada, M., Smith, B., Negrin, R.S., and Zeiser, R. (2008). Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of immunology* 181, 4770-4779.
- Rimmel, E., Terracciano, L., Noppen, C., Zajac, P., Heberer, M., Spagnoli, G.C., and Padovan, E. (2001). Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells in vitro. *Hum Immunol* 62, 39-49.
- Repka, T., Chiorean, E.G., Gay, J., Herwig, K.E., Kohl, V.K., Yee, D., and Miller, J.S. (2003). Trastuzumab and interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 2440-2446.
- Revenfeld, A.L., Baek, R., Nielsen, M.H., Stensballe, A., Varming, K., and Jorgensen, M. (2014). Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical therapeutics* 36, 830-846.
- Ricklefs, F.L., Alayo, Q., Krenzlin, H., Mahmoud, A.B., Speranza, M.C., Nakashima, H., Hayes, J.L., Lee, K., Balaj, L., Passaro, C., *et al.* (2018). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv* 4, eaar2766.
- Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E., and Galand, P. (1991). Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *The American journal of pathology* 138, 447-453.
- Robbins, P.D., and Morelli, A.E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature reviews Immunology* 14, 195-208.
- Roche, P.A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature reviews Immunology* 15, 203-216.
- Rodionova, E., Conzelmann, M., Maraskovsky, E., Hess, M., Kirsch, M., Giese, T., Ho, A.D., Zoller, M., Dreger, P., and Luft, T. (2007). GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109, 1584-1592.
- Rodrigues, G., Hoshino, A., Kenific, C.M., Matei, I.R., Steiner, L., Freitas, D., Kim, H.S., Oxley, P.R., Scandariato, I., Casanova-Salas, I., *et al.* (2019). Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. *Nature cell biology* 21, 1403-1412.
- Romagnoli, G.G., Zelante, B.B., Toniolo, P.A., Migliori, I.K., and Barbuto, J.A.M. (2015). Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. *Frontiers in immunology* 5, 692.
- Roozendaal, R., and Mebius, R.E. (2011). Stromal cell-immune cell interactions. *Annual review of immunology* 29, 23-43.

- Rossy, J., Owen, D.M., Williamson, D.J., Yang, Z., and Gaus, K. (2013). Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signaling. *Nature immunology* *14*, 82-89.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* *272*, 1023-1026.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C.M., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E.S., Rugo, H.S., and Coussens, L.M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer cell* *26*, 623-637.
- Rupaimoole, R., Calin, G.A., Lopez-Berestein, G., and Sood, A.K. (2016). miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer discovery* *6*, 235-246.
- Rupp, A.K., Rupp, C., Keller, S., Brase, J.C., Ehehalt, R., Fogel, M., Moldenhauer, G., Marme, F., Sultmann, H., and Altevogt, P. (2011). Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecologic oncology* *122*, 437-446.
- Rylatt, D.B., Aitken, A., Bilham, T., Condon, G.D., Embi, N., and Cohen, P. (1980). Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* *107*, 529-537.
- Sabado, R.L., Balan, S., and Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell research* *27*, 74-95.
- Salaroglio, I.C., Kopecka, J., Napoli, F., Pradotto, M., Maletta, F., Costardi, L., Gagliasso, M., Milosevic, V., Ananthanarayanan, P., Bironzo, P., *et al.* (2019). Potential Diagnostic and Prognostic Role of Microenvironment in Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* *14*, 1458-1471.
- Salcedo, T.W., Azzoni, L., Wolf, S.F., and Perussia, B. (1993). Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *Journal of immunology* *151*, 2511-2520.
- Samanta, S., Rajasingh, S., Drosos, N., Zhou, Z., Dawn, B., and Rajasingh, J. (2018). Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta pharmacologica Sinica* *39*, 501-513.
- Sapre, S., and Thakur, R. (2014). Lifestyle and dietary factors determine age at natural menopause. *J Midlife Health* *5*, 3-5.
- Sato-Kuwabara, Y., Melo, S.A., Soares, F.A., and Calin, G.A. (2015a). The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). *International journal of oncology* *46*, 17-27.
- Sato-Kuwabara, Y., Melo, S.A., Soares, F.A., and Calin, G.A. (2015b). The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles-diagnostic and therapeutic implications. *International journal of oncology* *46*, 17-27.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 18538-18543.

- Sato, Y., Takahashi, S., Kinouchi, Y., Shiraki, M., Endo, K., Matsumura, Y., Kakuta, Y., Tosa, M., Motida, A., Abe, H., *et al.* (2006). IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis* 27, 1068-1073.
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.T., Berman, D.M., and Wolchok, J.D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33, 1889-1894.
- Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., and Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69-74.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* 14, 2501-2514.
- Seliger, B. (2016). Molecular mechanisms of HLA class I-mediated immune evasion of human tumors and their role in resistance to immunotherapies. *Hla* 88, 213-220.
- Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation* 118, 3835-3837.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
- Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348, 56-61.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707-723.
- Sheehan, C., and D'Souza-Schorey, C. (2019). Tumor-derived extracellular vesicles: molecular parcels that enable regulation of the immune response in cancer. *Journal of cell science* 132.
- Shen, J., Hu, Q., Schrauder, M., Yan, L., Wang, D., Medico, L., Guo, Y., Yao, S., Zhu, Q., Liu, B., *et al.* (2014). Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget* 5, 5284-5294.
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., *et al.* (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer research* 71, 2926-2937.
- Shimobayashi, M., and Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 155-162.
- Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., *et al.* (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer science* 107, 326-334.
- Shortman, K., and Heath, W.R. (2001). Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nature immunology* 2, 988-989.
- Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters* 267, 204-215.

- Sim, W.J., Ahl, P.J., and Connolly, J.E. (2016). Metabolism Is Central to Tolerogenic Dendritic Cell Function. *Mediators of inflammation* 2016, 2636701.
- Singh, R., Mishra, M.K., and Aggarwal, H. (2017). Inflammation, Immunity, and Cancer. *Mediators of inflammation* 2017, 6027305.
- Singh, Y., Garden, O.A., Lang, F., and Cobb, B.S. (2015). MicroRNA-15b/16 Enhances the Induction of Regulatory T Cells by Regulating the Expression of Rictor and mTOR. *Journal of immunology* 195, 5667-5677.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., *et al.* (2012). Impaired IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer research* 72, 5188-5197.
- Slaney, C.Y., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2014). Trafficking of T cells into tumors. *Cancer research* 74, 7168-7174.
- Smith, A.M., Qualls, J.E., O'Brien, K., Balouzian, L., Johnson, P.F., Schultz-Cherry, S., Smale, S.T., and Murray, P.J. (2011). A distal enhancer in *Il12b* is the target of transcriptional repression by the STAT3 pathway and requires the basic leucine zipper (B-ZIP) protein NFIL3. *The Journal of biological chemistry* 286, 23582-23590.
- Smith, H.A., and Kang, Y. (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *Journal of molecular medicine* 91, 411-429.
- Snyder, J.P., and Amiel, E. (2018). Regulation of Dendritic Cell Immune Function and Metabolism by Cellular Nutrient Sensor Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). *Frontiers in immunology* 9, 3145.
- Sochor, M., Basova, P., Pesta, M., Dusilkova, N., Bartos, J., Burda, P., Pospisil, V., and Stopka, T. (2014). Oncogenic microRNAs: miR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC cancer* 14, 448.
- Soucek, L., Lawlor, E.R., Soto, D., Shchors, K., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2007). Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nature medicine* 13, 1211-1218.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell* 6, 447-458.
- Spath, G.F., and Beverley, S.M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol* 99, 97-103.
- Spranger, S., Dai, D., Horton, B., and Gajewski, T.F. (2017). Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer cell* 31, 711-723 e714.
- Spranger, S., Luke, J.J., Bao, R., Zha, Y., Hernandez, K.M., Li, Y., Gajewski, A.P., Andrade, J., and Gajewski, T.F. (2016). Density of immunogenic antigens does not explain the presence or absence of the T-cell-inflamed tumor microenvironment in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E7759-E7768.
- Srivastava, A., Filant, J., Moxley, K.M., Sood, A., McMeekin, S., and Ramesh, R. (2015). Exosomes: a role for naturally occurring nanovesicles in cancer growth, diagnosis and treatment. *Curr Gene Ther* 15, 182-192.

- Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468-2476.
- Sueta, A., Yamamoto, Y., Tomiguchi, M., Takeshita, T., Yamamoto-Ibusuki, M., and Iwase, H. (2017). Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget* 8, 69934-69944.
- Sugden, P.H., Fuller, S.J., Weiss, S.C., and Clerk, A. (2008). Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S137-153.
- Sukhbaatar, N., Hengstschlager, M., and Weichhart, T. (2016). mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends in immunology* 37, 778-789.
- Sun, W., Luo, J.D., Jiang, H., and Duan, D.D. (2018). Tumor exosomes: a double-edged sword in cancer therapy. *Acta pharmacologica Sinica* 39, 534-541.
- Sun, X., Lin, J., Zhang, Y., Kang, S., Belkin, N., Wara, A.K., Icli, B., Hamburg, N.M., Li, D., and Feinberg, M.W. (2016). MicroRNA-181b Improves Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity by Regulating Endothelial Function in White Adipose Tissue. *Circ Res* 118, 810-821.
- Surakasula, A., Nagarjunapu, G.C., and Raghavaiah, K.V. (2014). A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. *J Res Pharm Pract* 3, 12-18.
- Sutherland, C. (2011). What are the bona fide GSK3 substrates? *International journal of Alzheimer's Disease* 2011.
- Swartz, M.A., Iida, N., Roberts, E.W., Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., Coussens, L.M., and DeClerck, Y.A. (2012). Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer research* 72, 2473-2480.
- Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M.J., Mandapathil, M., and Whiteside, T.L. (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PloS one* 5, e11469.
- Tai, X., Van Laethem, F., Pobeziński, L., Guinter, T., Sharrow, S.O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C.B., *et al.* (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 119, 5155-5163.
- Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., and Wei, W. (2018a). Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in pharmacology* 9, 642.
- Tai, Y.L., Chen, K.C., Hsieh, J.T., and Shen, T.L. (2018b). Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer science* 109, 2364-2374.
- Takahashi-Yanaga, F., Shiraishi, F., Hirata, M., Miwa, Y., Morimoto, S., and Sasaguri, T. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta is tyrosine-phosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 411-415.
- Tang, X., Hou, Y., Yang, G., Wang, X., Tang, S., Du, Y.E., Yang, L., Yu, T., Zhang, H., Zhou, M., *et al.* (2016). Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling. *Cell death and differentiation* 23, 132-145.

- Taniguchi, K., and Karin, M. (2018). NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature reviews Immunology*.
- Tao, T., Wang, Y., Luo, H., Yao, L., Wang, L., Wang, J., Yan, W., Zhang, J., Wang, H., Shi, Y., *et al.* (2013). Involvement of FOS-mediated miR-181b/miR-21 signalling in the progression of malignant gliomas. *European journal of cancer* *49*, 3055-3063.
- Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., and Dulin, N.O. (2006). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* *281*, 9971-9976.
- Taylor, A., Harker, J.A., Chanthong, K., Stevenson, P.G., Zuniga, E.I., and Rudd, C.E. (2016). Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Drives T-bet-Mediated Downregulation of Co-receptor PD-1 to Enhance CD8(+) Cytolytic T Cell Responses. *Immunity* *44*, 274-286.
- Taylor, A., Rothstein, D., and Rudd, C.E. (2018). Small-Molecule Inhibition of PD-1 Transcription Is an Effective Alternative to Antibody Blockade in Cancer Therapy. *Cancer research* *78*, 706-717.
- Taylor, A., and Rudd, C.E. (2017). Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Compensates for the Lack of CD28 in the Priming of CD8(+) Cytotoxic T-Cells: Implications for anti-PD-1 Immunotherapy. *Frontiers in immunology* *8*, 1653.
- Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* *110*, 13-21.
- Theodoraki, M.N., Yerneni, S.S., Hoffmann, T.K., Gooding, W.E., and Whiteside, T.L. (2018). Clinical Significance of PD-L1(+) Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *24*, 896-905.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology* *Chapter 3*, Unit 3 22.
- Thomachot, M.C., Bendriss-Vermare, N., Massacrier, C., Biota, C., Treilleux, I., Goddard, S., Caux, C., Bachelot, T., Blay, J.Y., and Menetrier-Caux, C. (2004). Breast carcinoma cells promote the differentiation of CD34+ progenitors towards 2 different subpopulations of dendritic cells with CD1a(high)CD86(-)Langerin- and CD1a(+)CD86(+)Langerin+ phenotypes. *International journal of cancer* *110*, 710-720.
- Thornton, T.M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C.D., Aronshtam, A., Clements, J.L., Sabio, G., Davis, R.J., Matthews, D.E., Doble, B., *et al.* (2008). Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* *320*, 667-670.
- Thwe, P.M., Pelgrom, L.R., Cooper, R., Beauchamp, S., Reisz, J.A., D'Alessandro, A., Everts, B., and Amiel, E. (2017). Cell-Intrinsic Glycogen Metabolism Supports Early Glycolytic Reprogramming Required for Dendritic Cell Immune Responses. *Cell metabolism* *26*, 558-567 e555.
- Tian, Y., Fu, X., Li, Q., Wang, Y., Fan, D., Zhou, Q., Kuang, W., and Shen, L. (2018). MicroRNA181 serves an oncogenic role in breast cancer via the inhibition of SPRY4. *Molecular medicine reports* *18*, 5603-5613.
- Toniolo, P.A., Liu, S., Yeh, J.E., Ye, D.Q., Barbuto, J.A., and Frank, D.A. (2016). Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* *7*, 46301-46314.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* *319*, 1244-1247.

- Tran Janco, J.M., Lamichhane, P., Karyampudi, L., and Knutson, K.L. (2015). Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *Journal of immunology* *194*, 2985-2991.
- Tugues, S., Burkhard, S.H., Ohs, I., Vrohling, M., Nussbaum, K., Vom Berg, J., Kulig, P., and Becher, B. (2015). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell death and differentiation* *22*, 237-246.
- Tung, S.L., Boardman, D.A., Sen, M., Letizia, M., Peng, Q., Cianci, N., Dioni, L., Carlin, L.M., Lechler, R., Bollati, V., *et al.* (2018). Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Scientific reports* *8*, 6065.
- Ueha, S., Shand, F.H., and Matsushima, K. (2011). Myeloid cell population dynamics in healthy and tumor-bearing mice. *International immunopharmacology* *11*, 783-788.
- Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature reviews Immunology* *4*, 641-648.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology* *9*, 654-659.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* *274*, 787-789.
- van Blitterswijk, W.J., Emmelot, P., Hilkmann, H.A., Hilgers, J., and Feltkamp, C.A. (1979). Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumour-associated surface antigens (MLr), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL). *International journal of cancer* *23*, 62-70.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* *29*, 235-271.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* *13*, 423-433.
- Vieira, L.Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T., and Scott, P. (1996). Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *Journal of immunology* *157*, 827-835.
- Vijay, G.V., Zhao, N., Den Hollander, P., Toneff, M.J., Joseph, R., Pietila, M., Taube, J.H., Sarkar, T.R., Ramirez-Pena, E., Werden, S.J., *et al.* (2019). GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR* *21*, 37.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications* *4*, 2980.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* *274*, 784-787.
- Wang, F., Li, B., Wei, Y., Zhao, Y., Wang, L., Zhang, P., Yang, J., He, W., Chen, H., Jiao, Z., *et al.* (2018). Tumor-derived exosomes induce PD1(+) macrophage population in human gastric cancer that promotes disease progression. *Oncogenesis* *7*, 41.

- Wang, F., Zheng, Z., Guo, J., and Ding, X. (2010). Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecologic oncology* *119*, 586-593.
- Wang, H., Brown, J., and Martin, M. (2011). Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* *53*, 130-140.
- Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., and Shi, S. (2013a). IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells* *31*, 1383-1395.
- Wang, R.F., and Wang, H.Y. (2017). Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell research* *27*, 11-37.
- Wang, S., Liang, C., Ai, H., Yang, M., Yi, J., Liu, L., Song, Z., Bao, Y., Li, Y., Sun, L., *et al.* (2019). Hepatic miR-181b-5p Contributes to Glycogen Synthesis Through Targeting EGR1. *Digestive diseases and sciences* *64*, 1548-1559.
- Wang, Y., Huang, G., Zeng, H., Yang, K., Lamb, R.F., and Chi, H. (2013b). Tuberous sclerosis 1 (Tsc1)-dependent metabolic checkpoint controls development of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E4894-4903.
- Wculek, S.K., Khouili, S.C., Priego, E., Heras-Murillo, I., and Sancho, D. (2019). Metabolic Control of Dendritic Cell Functions: Digesting Information. *Frontiers in immunology* *10*, 775.
- Weichhart, T., Hengstschlager, M., and Linke, M. (2015). Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nature reviews Immunology* *15*, 599-614.
- Wieckowski, E.U., Visus, C., Szajnik, M., Szczepanski, M.J., Storkus, W.J., and Whiteside, T.L. (2009). Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *Journal of immunology* *183*, 3720-3730.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., and Villadangos, J.A. (2004). Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* *103*, 2187-2195.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., *et al.* (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine* *7*, 297-303.
- Wong, N., and Wang, X. (2015). miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research* *43*, D146-152.
- Woodgett, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO journal* *9*, 2431-2438.
- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature cell biology* *13*, 838-845.
- Wykes, M., and MacPherson, G. (2000). Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology* *100*, 1-3.
- Xiong, D.D., Lv, J., Wei, K.L., Feng, Z.B., Chen, J.T., Liu, K.C., Chen, G., and Luo, D.Z. (2017). A nine-miRNA signature as a potential diagnostic marker for breast carcinoma: An integrated study of 1,110 cases. *Oncology reports* *37*, 3297-3304.

- Xu, R., Greening, D.W., Zhu, H.J., Takahashi, N., and Simpson, R.J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of clinical investigation* *126*, 1152-1162.
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D.W., and Simpson, R.J. (2018). Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nature reviews Clinical oncology* *15*, 617-638.
- Xu, X., Tan, Y., Qian, Y., Xue, W., Wang, Y., Du, J., Jin, L., and Ding, W. (2019). Clinicopathologic and prognostic significance of tumor-infiltrating CD8⁺ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Medicine* *98*, e13923.
- Yang, L., Calay, E.S., Fan, J., Arduini, A., Kunz, R.C., Gygi, S.P., Yalcin, A., Fu, S., and Hotamisligil, G.S. (2015). METABOLISM. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction. *Science* *349*, 500-506.
- Yang, N., Zhu, S., Lv, X., Qiao, Y., Liu, Y.J., and Chen, J. (2018a). MicroRNAs: Pleiotropic Regulators in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology* *9*, 2491.
- Yang, Y., Li, C.W., Chan, L.C., Wei, Y., Hsu, J.M., Xia, W., Cha, J.H., Hou, J., Hsu, J.L., Sun, L., *et al.* (2018b). Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell research* *28*, 862-864.
- Ye, S.B., Li, Z.L., Luo, D.H., Huang, B.J., Chen, Y.S., Zhang, X.S., Cui, J., Zeng, Y.X., and Li, J. (2014). Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* *5*, 5439-5452.
- Yen, K.E., Bittinger, M.A., Su, S.M., and Fantin, V.R. (2010). Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene* *29*, 6409-6417.
- Yin, M., Loyer, X., and Boulanger, C.M. (2015). Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *European journal of pharmacology* *763*, 90-103.
- Yin, Y., Cai, X., Chen, X., Liang, H., Zhang, Y., Li, J., Wang, Z., Chen, X., Zhang, W., and Yokoyama, S. (2014). Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth. *Cell research* *24*, 1164-1180.
- Ying, X., Wu, Q., Wu, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X., and Wang, X. (2016). Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* *7*, 43076-43087.
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., *et al.* (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature communications* *5*, 3591.
- Yu, X., Liang, J., Xu, J., Li, X., Xing, S., Li, H., Liu, W., Liu, D., Xu, J., Huang, L., *et al.* (2018). Identification and Validation of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Early Detection Based on Large Scale Tissue-Derived Data. *J Breast Cancer* *21*, 363-370.
- Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences* *7*, 651-658.
- Zearo, S., Kim, E., Zhu, Y., Zhao, J.T., Sidhu, S.B., Robinson, B.G., and Soon, P. (2014). MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC cancer* *14*, 200.

- Zeng, M., Mao, X.H., Li, J.X., Tong, W.D., Wang, B., Zhang, Y.J., Guo, G., Zhao, Z.J., Li, L., Wu, D.L., *et al.* (2015). Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *386*, 1457-1464.
- Zhang, J.Y., Zhao, Y.L., Lv, Y.P., Cheng, P., Chen, W., Duan, M., Teng, Y.S., Wang, T.T., Peng, L.S., Mao, F.Y., *et al.* (2018). Modulation of CD8(+) memory stem T cell activity and glycogen synthase kinase 3beta inhibition enhances anti-tumoral immunity in gastric cancer. *Oncoimmunology* *7*, e1412900.
- Zhang, Q., Zhu, B., and Li, Y. (2017). Resolution of Cancer-Promoting Inflammation: A New Approach for Anticancer Therapy. *Frontiers in immunology* *8*, 71.
- Zhang, W., Shen, X., Xie, L., Chu, M., and Ma, Y. (2015). MicroRNA-181b regulates endotoxin tolerance by targeting IL-6 in macrophage RAW264.7 cells. *Journal of inflammation* *12*, 18.
- Zheng, Y., Lv, X., Wang, X., Wang, B., Shao, X., Huang, Y., Shi, L., Chen, Z., Huang, J., and Huang, P. (2016). MiR-181b promotes chemoresistance in breast cancer by regulating Bim expression. *Oncology reports* *35*, 683-690.
- Zhou, J., Tang, Z., Gao, S., Li, C., Feng, Y., and Zhou, X. (2020). Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Frontiers in oncology* *10*, 188.
- Zhou, M., Chen, J., Zhou, L., Chen, W., Ding, G., and Cao, L. (2014). Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203. *Cellular immunology* *292*, 65-69.
- Zhu, J., Wang, F.L., Wang, H.B., Dong, N., Zhu, X.M., Wu, Y., Wang, Y.T., and Yao, Y.M. (2017). TNF-alpha mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Scientific reports* *7*, 12239.
- Zhu, Q., Yang, J., Han, S., Liu, J., Holzbeierlein, J., Thrasher, J.B., and Li, B. (2011). Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *The Prostate* *71*, 835-845.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews Immunology* *8*, 59-73.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine* *4*, 594-600.
- Zomer, A., Maynard, C., Verweij, F.J., Kamermans, A., Schafer, R., Beerling, E., Schiffelers, R.M., de Wit, E., Berenguer, J., Ellenbroek, S.I.J., *et al.* (2015). In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* *161*, 1046-1057.
- Zong, W.X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & development* *20*, 1-15.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do papel de exossomos isolados a partir de sangue periférico de pacientes com câncer na diferenciação de células dendríticas: possíveis implicações na resposta imune antitumoral.

Pesquisador: Nayara Delgado André Bortoleto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26730414.5.0000.5545

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal de São João Del Rei - C. C. Oeste Dona

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 538.451

Data da Relatoria: 26/02/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, analítico. Serão isolados exossomos (nanovesículas derivadas da membrana, de 50-100 μ m, que podem mediar a comunicação entre células e podem carrear lipídeos, proteínas, mRNA e microRNAs) de plasma de pacientes com câncer de mama e ovário, grupo teste, bem como de doadores saudáveis, grupo controle. Posteriormente, será avaliado, por métodos experimentais de cultura de células, a influência que os mesmos exercem no fenótipo e atividade das células dendríticas. As células dendríticas são imprescindíveis na resposta imune antitumoral, que como já demonstrado na literatura, estão prejudicadas nesses pacientes. O isolamento de exossomos de pacientes com câncer (40 pacientes), bem como de doadores saudáveis (20 controles), será realizado por ultracentrifugação. Será feita uma cinética, onde diferentes concentrações de exossomos, após caracterização por microscopia eletrônica e citometria de fluxo (ou imunoblot), serão colocados em culturas de monócitos, células dendríticas imaturas e maduras e, ao final de 1, 3 e 7 dias, essas células serão avaliadas quanto ao grau de maturação através da avaliação de marcadores de superfície via de citometria de fluxo, bem como quanto à sua atividade. Para tanto, as células expostas ou não à diferentes concentrações de exossomos, de pacientes e doadores saudáveis, serão co-cultivadas com linfócitos, e ao final, avaliado o perfil de linfócitos gerados

Endereço: SEBASTIAO GONCALVES COELHO

Bairro: CHANADOUR

CEP: 35.501-296

UF: MG

Município: DIVINOPOLIS

Telefone: (37)3221-1580

Fax: (37)3221-1580

E-mail: cepes_cco@ufs.br

Continuação do Parecer: 538.451

através da dosagem de citocinas e análise de expressão de FoxP3, marcador característico de linfócitos T reguladores.

Poderão ser incluídas no estudo mulheres recém diagnosticadas com carcinoma de mama ductal invasivo ou ovário que ainda não foram submetidas a nenhuma forma de tratamento, seja ele cirúrgico, quimioterápico, radioterápico ou hormonal e doadores saudáveis, maiores de 18 anos, incluindo alunos de graduação, pós-graduação, técnicos e docentes da UFSJ.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se exossomos, derivados de soro de pacientes com carcinoma mamário ductal invasivo e ovário, podem induzir alterações na maturação e atividade de células dendríticas, bem como induzir à supressão da resposta imunológica através da ativação de linfócitos T reguladores.

Objetivo Secundário:

- Purificar e caracterizar exossomos a partir de sangue periférico de pacientes com carcinoma de mama ductal invasivo e câncer de ovário;
- avaliar o fenótipo de monócitos obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis, após incubação com e sem exossomos;
- avaliar o fenótipo de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos in vitro após cultura dos mesmos com e sem exossomos;
- avaliação do perfil de citocinas após cocultura de DCs geradas com e sem exossomos com linfócitos obtidos a partir de doadores saudáveis;
- avaliar a expressão de FoxP3 dos linfócitos após co-cultura de DCs geradas com e sem exossomos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos da pesquisa envolvem possível desconforto com a coleta e possibilidade de leves hematomas, o que será minimizado uma vez que a coleta será realizada por profissionais biomédicos capacitados para este fim e integrantes da equipe do projeto, a fim de garantir que sejam seguidos os preceitos éticos e a coleta adequada da amostra, que deve ser obtida antes de qualquer tipo de tratamento do paciente. Outro possível risco seria a quebra de sigilo das informações preenchidas no questionário ou os resultados da pesquisa. No entanto, tanto o questionário como o material biológico serão manipulados por apenas uma pesquisadora, que será devidamente treinada. Ainda assim, todos os membros da equipe assinaram um termo de compromisso no sigilo dos dados e todos os pacientes serão identificados por códigos. A coleta de sangue por integrante da equipe foi autorizada tanto pela oncologista

Endereço: SEBASTIAO GONCALVES COELHO

Bairro: CHANADOUR

CEP: 35.501-296

UF: MG

Município: DIVINOPOLIS

Telefone: (37)3221-1580

Fax: (37)3221-1580

E-mail: cepes_cco@ufs.edu.br

Continuação do Parecer: 538.451

clínica integrante do projeto bem como pela coordenadora do setor de oncologia. Os membros da equipe também assinaram um termo de compromisso se responsabilizando pelo sigilo dos dados.

A participação dos voluntários é de extrema importância a fim de permitir uma melhor compreensão do papel desempenhado pelo tumor sobre as células dendríticas, células do sistema imune responsáveis pela defesa do organismo que estão com a função comprometida em pacientes com neoplasia e, assim, permitir estudos que visem a busca do restabelecimento da função das DCs de pacientes para imunoterapia do câncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito bem escrita, relevante, e bem fundamentada cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Folha de rosto, com assinatura do responsável pela instituição proponente;
- Cartas de Anuência e Infraestrutura assinadas pelos responsáveis do setor no hospital em estudo;
- TCLE para os participantes da pesquisa (doador saudável e paciente);
- Termo de Compromisso para Utilização de Dados dos Pacientes assinado pelos pesquisadores;
- Questionário

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu à todas as pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: SEBASTIAO GONCALVES COELHO
Bairro: CHANADOUR CEP: 35.501-296
UF: MG Município: DIVINOPOLIS
Telefone: (37)3221-1580 Fax: (37)3221-1580 E-mail: cepes_cco@ufs.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL
REI - CAMPUS CENTRO



Continuação do Parecer: 538.451

DIVINOPOLIS, 24 de Fevereiro de 2014

Juliana Dias Reis Pessalacia

Assinador por:
Juliana Dias Reis Pessalacia
(Coordenador)

Endereço: SEBASTIAO GONCALVES COELHO
Bairro: CHANADOUR **CEP:** 35.501-296
UF: MG **Município:** DIVINOPOLIS
Telefone: (37)3221-1580 **Fax:** (37)3221-1580 **E-mail:** cepes_cco@ufsj.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 123/2019

Título do projeto: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXOSSOMOS DE TUMOR DE MAMA NA RESOLUÇÃO DE INFECÇÕES

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Helton C Santiago

Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas

Departamento: Departamento de Bioquimica e Imunologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 05/08/2019. Validade: 05/08/2019 à 04/08/2024

Belo Horizonte, 05/08/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXOSSOMOS DE TUMOR DE MAMA NA RESOLUÇÃO DE INFECÇÕES", protocolo do CEUA: 123/2019 sob a responsabilidade de Helton C Santiago que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 05/08/2019.

Vigência da Autorização	05/08/2019 a 04/08/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	11
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	22
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	11
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	14
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	27
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	14
Peso/Idade	20g / 6(semanas)

Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	11
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	22
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	11
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/c
Nº de animais	11
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central

Considerações posteriores:

05/08/2019	Aprovado na reunião do dia 05/08/2019. Validade: 05/08/2019 à 04/08/2024
------------	--

Belo Horizonte, 07/08/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br