

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES EM
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA E SEU POSSÍVEL
IMPACTO NO PERFIL DE COMPROMETIMENTO IMUNE**

Belo Horizonte

2018

TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES EM
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA E SEU POSSÍVEL
IMPACTO NO PERFIL DE COMPROMETIMENTO IMUNE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Adriano de Paula Sabino.

Coorientador: Juliano Simões de Toledo

Belo Horizonte

2018

A447c Almeida, Tâmara Dauare de.
Caracterização de microvesículas extracelulares em pacientes com leucemia linfocítica crônica e seu possível impacto no perfil de comprometimento imune / Tâmara Dauare de Almeida. – 2018.

91 f. : il.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientador: Juliano Simões de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Leucemia linfocítica crônica – Teses. 2. Prognóstico – Teses. 3. Vesícula – Teses. 4. Linfócitos – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Toledo, Juliano Simões de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99419

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/2811



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caracterização do perfil de vesículas extracelulares em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica e seu possível impacto no perfil de comprometimento imune.

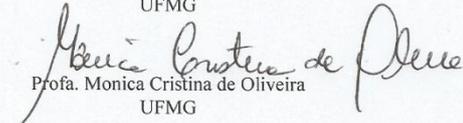
TÂMARA DAUARE DE ALMEIDA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 13 de junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador
UFMG


Profa. Tania Mara Pinto Dabés Guimarães
UFMG


Profa. Monica Cristina de Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 13 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda inspiração e condução.

A Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela estrutura e apoio.

Ao meu orientador, professor Adriano de Paula Sabino, pela confiança, aprendizado, apoio e direcionamentos nesta jornada.

Aos médicos Dr. Sergio Schusterschitz da Silva Araujo e Glaciano Nogueira Ribeiro pela crucial colaboração.

Aos pacientes e indivíduos do grupo controle que contribuíram voluntariamente com este estudo.

Aos colegas do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo convívio, especial agradecimento à, Suellen Rodrigues Martins, e Laís Dias Ribeiro pela ajuda e carinho; e especialíssimo agradecimento à Fernanda Cristina Gontijo Evangelista que foi, além de carinhosa, uma super companheira, instrutora, amiga e coorientadora de bancada.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais essa etapa da minha vida, em especial, Sued Eustaquio Mendes Miranda por todo apoio, cafés e risadas que me deram coragem para prosseguir.

A minha família, madrinha e namorado, pela afeição, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida. Em especial aos meus pais pelo amor e atenção incondicionais.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

RESUMO

A Leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica com aumento de linfócitos B principalmente por resistência a apoptose e com expressão aberrante de CD5 além de perfil de imunocomprometimento. As variações evolutivas individuais desses pacientes não podem ser previstas. Nesse contexto, novas ferramentas que ajudem a avaliar a progressão do paciente com LLC são importantes, dentre elas as microvesículas extracelulares (VEs). Já foi bem descrito como a fusão das VEs pode induzir a expressão de alguns genes, bem como podem ser consideradas um fator à evasão de tratamentos sendo um fator de alteração do microambiente. A hipótese deste estudo é que os estadiamentos diferentes desta doença estariam associados a um perfil de VEs diferentes, e que o tratamento seria capaz de modificar esse perfil. Pretendeu-se avaliar essas diferenças nas vesículas extracelulares do sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico de 28 pacientes com LLC e 24 indivíduos saudáveis s cultivadas *ex vivo* para avaliar perfis na distribuição de tamanho através da tecnologia de dispersão dinâmica da luz; na capacidade de interferir com expressão de CD3 avaliando expressão das cadeias γ , δ , ϵ , e ζ por qPCR; nos perfis imunofenotípico e proteico através da citometria de fluxo e extração proteica respectivamente; e na quantidade de VEs desse sobrenadante através da tecnologia de análise de rastreamento de nanopartículas; e possível variação desses parâmetros após exposição ao quimioterápico fludarabina. As VEs não tiveram diferenças significativas quanto ao tamanho entre esses pacientes, suas classificações clínicas e grupo controle ($p > 0,1$). A expressão das cadeias de CD3 de sangue total, CD3 ϵ , e CD3 ζ tiveram expressão diminuída nos pacientes com LLC quando comparadas ao grupo controle ($p = 0,014$ e $p = 0,008$ respectivamente), já nas VEs, foi detectada expressão das cadeias, mas sem valor estatístico. A imunofenotipagem confirmou o perfil da predominância de VEs de origem linfocitária; já a extração proteica sugere a separação da classificação clínica entre pacientes Binet A e Binet B+C na análise do perfil de do tamanho molecular das proteínas. A concentração estimada de VEs do grupo controle, das VEs não expostas e expostas à fludarabina em cultura é de $9,66e+008$ ($\pm 0,35e+007$); $1,19e+009$ ($\pm 0,73e+007$); e $7,61e+008$ ($\pm 0,48e+007$) partículas por mL respectivamente. O número aumentado de VEs na LLC indica que a microvesiculação pode ser resultante da patogênese da doença sem estar

relacionada ao estadiamento. A expressão das cadeias do CD3 em pacientes com LLC estão aparentemente diminuídas em relação ao grupo controle, e as VEs podem ser possíveis ferramentas para modificação nesse perfil de expressão; embora sem diferença significativa na distribuição do tamanho das VEs em relação ao estadiamento e exposição a fludarabina, há aparente diferença em relação as suas concentrações.

Palavras-chave: Leucemia Linfocítica crônica. Prognóstico. Vesículas extracelulares. CD3.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematological malignancy with increased B lymphocytes mainly due to resistance to apoptosis and aberrant expression of CD5, in addition, an immunocompromised profile. Individual evolutionary changes in patients cannot be predicted. In this context, new tools that help evaluate the progression of the patient are important, among them extracellular microvesicles (EV). It has been well described how the fusion of the EVs can induce the expression genes, as well as they can be considered a factor to the resistance to treatments being a factor of alteration of the microenvironment. The hypothesis of this study is that the different stages of this disease would be associated with a different EV profile, and that the treatment would be able to modify this profile as well. These differences in the extracellular vesicles were assessed in the supernatant of the peripheral blood mononuclear cell supernatant from 28 CLL patients and 24 healthy controls cultured *ex vivo*. The aim was to evaluate profiles in size distribution by dynamic light scattering technology; the ability to interfere with CD3 expression by evaluating expression of the γ , δ , ϵ , and ζ chains by qPCR; in the immunophenotypic and protein profiles through flow cytometry and protein extraction respectively; and the amount of EV of that supernatant through nanoparticle tracing analysis technology; and possible variation of these parameters after exposure to the fludarabine. EV had no significant differences in size among patients, their clinical classifications and controls ($p > 0.1$). The expression of the CD3 ϵ , CD3 ζ chains had decreased expression in the patients when compared to the control group ($p = 0.014$ and $p = 0.008$ respectively), whereas in the EV, chain expression was detected, but without statistical value. Immunophenotyping confirmed the profile of the predominance of EV of lymphocyte origin; the protein extraction suggests the separation of the clinical classification between Binet A and Binet B + C patients in the analysis of the molecular size profile of the proteins. The estimated EV concentration of the control, the non-exposed and exposed fludarabine EV in culture is $9.66e + 008$ ($\pm 0.35e + 007$); $1.19e + 009$ ($\pm 0.73e + 007$) and $7.61e + 008$ (\pm

0.48e + 007) particles per ml, respectively. The increased number of EV in CLL indicates that microvesiculation may result from the pathogenesis of the disease without being related to staging. Expression of the CD3 chains in CLL patients are apparently decreased relative to controls, and EVs may be involved in modifying this expression profile; although absence of significant difference in the distribution of EV size in relation to staging and exposure to fludarabine, there is an apparent difference in relation to its concentrations.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia. Prognosis. Extracellular vesicles.CD3.

Figuras

Figura 1- Campo de Leucemia linfocítica crônica (microscopia óptica).....	21
Figura 2 –Vesículas extracelulares como componentes moduladores da matriz extracelular.....	28
Figura 3- Faixas de tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares membranares.	30
Figura 4- Liberação de micropartículas e exossomos.	31
Figura 5 - Representação do processo de formação das micropartículas extracelulares (MPs)..	33
Figura 6- “Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): Contagem visualização e análise de tamanho de partículas”.....	45
Figura 7 -Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares celulares (VEs).	46
Figura 8-Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares (VEs) para controle de isotipos.	47
Figura 9-Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares (VEs)	47
Figura 10- Determinação do diâmetro de VEs obtidas de grupo controle utilizando a análise de Rastreamento de Nanopartículas,(NTA)	57
Figura 11-Resultado da análise, por NTA no software NanoSight 2.3, de amostra de cultivo ex vivo sem exposição a fludarabina	57
Figura 12 - Resultado da análise, por NTA no software NanoSight 2.3, de amostra de cultivo ex vivo de PBMC exposta a fludarabina.....	58
Figura 13-Gráfico de distribuição do tamanho das VE por intensidade (%).	59
Figura 14- Gráfico de distribuição do tamanho das VEs por intensidade (%)	60
Figura 15-Gráfico de distribuição do tamanho das VEs por intensidade (%)	60
Figura 16- Perfil de amplificação da qPCR	64
Figura 17-Gel de poliacrilamida SDS-PAGE da extração proteica inicial de VEs do sobrenadante da cultura celular ex vivo de PBMC de pacientes com LLC.	67
Figura 18- Gel de poliacrilamida SDS-PAGE da extração proteica das VEs corado com prata	68
Figura 19- Estrutura da Fludarabina.Fludarabine; 21679-14-1; F-Ara-A.....	70
Figura 20- Receptor de células T (TCR) e sua interação com cadeias do complexo CD3.	74

QUADROS

Quadro 1-Sistema de estádio clínico por Rai et al (1987)	24
Quadro 2-Sistema de estádio clínico por Binet et al 1981	24
Quadro 3-Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados naPCR em tempo real.	50
Quadro 4- Composição do tampão de hidratação.....	51
Quadro 5-Composição solução TCA 10%.....	52
Quadro 6-Composição do gel de poliacrilamida SDS-PAGE utilizado para análise de extração proteica.....	52

TABELAS

Tabela 1 -Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LLC e grupo controle. ...	54
---	----

Gráficos

Gráfico 1 -Análise da sobrevivência de células de PBMC de pacientes com LLC cultivadas (<i>ex vivo</i>).....	56
Gráfico 2 - Concentração de VEs por NTA entre cultura de controle e pacientes com LLC.....	58
Gráfico 3 - Concentração de VEs por NTA nas diferentes populações	59
Gráfico 4 - Distribuição de tamanho dos exossomos (por intensidade).	61
Gráfico 5 - Distribuição de tamanho das micropartículas (por intensidade).	61
Gráfico 6 - Distribuição de tamanho dos corpos apoptóticos (por intensidade)	61
Gráfico 7 - Perfil de imunofenotipagem das VEs extracelulares marcadas com CD19	62
Gráfico 8 - Perfil de imunofenotipagem das VEs extracelulares marcadas com CD14.	62
Gráfico 9 - Quantidade de micropartículas.....	63
Gráfico 10 - Expressão da cadeia ϵ (épsilon) do complexo CD3.....	65
Gráfico 11 -Expressão do gene da cadeia δ (delta) do complexo CD3.....	65
Gráfico 13 -Expressão do gene da cadeia ζ (zeta) do complexo CD3..	66

SIGLAS E ABREVIATURAS

alloHCT	Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas
ANOVA	Análise de Variância
cDNA	DNA complementar
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
del(11q)	Deleção do braço longo do cromossomo 11
del(13q14.1)	Deleção do braço longo do cromossomo 13
del(17p)	Deleção do braço curto do cromossomo 17
del(6q)	Deleção do braço longo do cromossomo 6
DLS	Dispersão dinâmica de luz
FISH	Hibridização <i>fluorescente in situ</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
IgVH	Região variável da cadeia pesada de imunoglobulinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISEV	Sociedade internacional para vesículas extracelulares
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MEC	Matriz Extracelular
miR	Micro RNAs
MM	Mieloma múltiplo
MP	Micropartículas
MTT	3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	Células Natural Killer
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
OD	Densidades ópticas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão sódio-fosfato
PS	Fosfatidilserina
qPCR	PCR em tempo real
qsp	Quantidade suficiente para
RT	Transcriptase reversa
slg	Imunoglobulinas de superfície
SSC	<i>Side scatter</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Complexo do receptor de células T
TDL	Tempo de duplicação dos linfócitos
VEs	Microvesículas extracelulares
VIL	Vesículas intraluminais
Zap-70	Proteína cinase associada à cadeia de TCR de 70 kDa

Sumário

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Evolução do diagnóstico em leucemia.....	18
2.2 Leucemias.....	19
2.2.1 <i>Leucemia Linfocítica Crônica</i>	20
2.2.3 <i>Vesículas extracelulares</i>	27
2.2.4 <i>CD3 e a evasão imune</i>	35
3- JUSTIFICATIVA	36
4- OBJETIVOS.....	37
4.1- Objetivo Geral.....	37
4.2-Objetivos Específicos	37
5-MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Delineamento experimental.....	38
5.2 Casuística	39
5.2.1 <i>Critérios de inclusão</i>	40
5.2.2 <i>Critérios de exclusão</i>	40
5.3 Amostra biológica	40
5.4 Preparo do banco de dados	41
5.5 Métodos.....	41
5.5.1 <i>Obtenção e cultivo de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)</i> .	41
5.5.2 <i>Separação das vesículas extracelulares (VEs)</i>	43
5.5.4 <i>Avaliação da expressão de mRNA</i>	50
5.5.5 <i>Extração proteica das vesículas extracelulares</i>	51
5.6 Análise dos dados.....	53
6- RESULTADOS	54
6.1- Baseline	54
6.2- Validação do cultivo celular	55

6.3- Perfil de distribuição das VEs, por NTA, antes e após fludarabina	56
6.4- Perfil de distribuição das VEs, por DLS, antes e após exposição à fludarabina	59
6.5- Perfil de imunofenotipagem das VEs antes e após exposição à Fludarabina	61
6.6- Análise da expressão do mRNA dos genes do complexo TCR/CD3	63
6.7- Perfil proteico das VEs	67
7-DISCUSSÃO	69
8-CONCLUSÃO	77
9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A Leucemia linfocítica crônica (LLC) tem sido majoritariamente caracterizada como uma desordem clonal de linfócitos B em que a apoptose encontra-se deficiente sendo não só causa intrínseca da neoplasia como também influencia o comportamento dessas células nesse microambiente (FRENZEL et al, 2016).

A incidência da doença é semelhante por todo o mundo. Em 2012, o Brasil registrou 5935 mortes por leucemia, sendo 3202 em homens e 2733 em mulheres (INCA, 2017).

A principal causa da heterogeneidade e as principais alterações que levam a progressão da LLC são desconhecidas. Um fator importante associado com a progressão da doença e prognóstico desfavorável seria a capacidade dos clones leucêmicos de manipular o microambiente à sua sobrevivência. Há estudos que demonstram a importância da comunicação entre células tumorais e seus microambientes através da participação de (micro) vesículas extracelulares (VEs), que podem se fundir a células próximas e /ou células que estão nos seus trajetos circulatórios (MIEKUS; et al., 2006; ALIOTTA et al., 2011; HADERK et al., 2013).

As VEs são originadas de membranas celulares de células normais e saudáveis bem como de células malignas e podem “sequestrar” componentes membranares e carrear nessas vesículas componentes citoplasmáticos originários do seu tipo celular. As VEs, portanto, contém numerosas proteínas e lipídeos similares aos das células de sua origem e isso provavelmente facilita a integração das VEs com outras células que porventura entrem em contato na circulação. Logo, o conteúdo das VE e o impacto da sua função biológica dependeriam da sua célula de origem (GYÖRGY *et al.*, 2011). Essa capacidade já foi comprovada de várias maneiras, dentre elas a ação de VEs de câncer do ovário que estimulam a angiogênese e VEs originárias de plaquetas promovendo progressão tumoral e metástase pulmonar (GIUSTI et al., 2013). Já existem relatos de fusão e transferências do conteúdo vesicular para células como moléculas de DNA ou mRNA (MAYR, *et al.*, 2009; BROOKS *et al.*, 2010). A entrada de microvesículas nas células pode mediar alterações específicas

do tecido por entrega direta de mRNA e indução de transcrição (ALIOTTA *et al.*, 2011).

A expressão anormal do complexo CD3 do receptor de células T, TCR, importante na diferenciação das células T, pode estar relacionada ao estado imune celular anormal em doenças hematológicas. A disfunção de células T em pacientes com LLC pode estar atribuída à expressão alterada de componentes do complexo TCR / CD3 e tirosina quinases intracelulares associadas. Múltiplas anormalidades de células T, especialmente no estado indolente da LLC, sugerem um estado de ativação crônica e aberrante (LI, 2008).

Baseando-se no princípio de que ao transferir RNA e proteínas de sua célula de origem, as VEs podem reprogramar células-alvo, assume-se, então a possibilidade de seu envolvimento em mudanças dentro do microambiente celular- um fator chave na patogênese de LLC (HADERK *et al.*, 2013). Nessa circunstância, falta elucidar, por exemplo, os efeitos da administração de quimioterapia sobre as características e conteúdo das VEs dos pacientes com LLC (AHARON *et al.*, 2017). Além disso, cerca de 20% dos pacientes com LLC apresentam algum tipo de evasão imune, seja de caráter imunohemolítica, seja maior susceptibilidade às infecções. Isso faz questionar, nesse contexto, a implicação desse microambiente e seus fatores para o quadro de evasão imune, nesses pacientes. Dentre esses fatores, podemos citar o envolvimento do complexo TCR/CD3 cuja expressão anormal tem-se correlacionado com função irregular das células T (UPRETI *et al.*, 2016). Dessa maneira, há ainda muito que esclarecer como, por exemplo, se e/ou como as VEs podem estar relacionadas com essa interferência na expressão do complexo TCR/CD3 no pacientes com LLC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Evolução do diagnóstico em leucemia

A leucemia foi descrita pela primeira vez por Peter Cullen em 1811, em um relato de caso de hiperplasia aguda do baço de um paciente cujo soro tinha aparência “leitosa”, mas naquele período, ele não conseguiu correlacionar os dados clínicos. Foi então que em março de 1825 Alfred Armand apresentou um relato de autópsia de um paciente cujos sintomas e sinais são utilizados até os dias atuais como diagnóstico precoce de leucemia: inchaço abdominal, febre, fraqueza, e alteração na composição do sangue que tinha aparência de um “sangue cheio de pus” (KAMPEN, 2012).

Donné foi o pioneiro no estudo das células leucêmicas a nível de microscopia. Ele publicou um manuscrito em 1844 da análise histológica do “sangue purulento” de um paciente com esplenomegalia cuja aparência se revelou impossível de ser distinguida de glóbulos brancos normais mesmo pelo seu excesso. Ele implicou que o aumento dos glóbulos brancos foi causado por uma dificuldade na diferenciação, que atualmente ainda é a principal característica da leucemia (MANDLE, 1839).

O termo leucemia foi utilizado pela primeira vez em 1847 por Virchow. No seu relato de caso de uma paciente com “leucocitemia” com esplenomegalia e sangramento nasal, ele descreveu a aparência alterada do sangue com acúmulo de células brancas tal que parecia suprimir a produção de células vermelhas que estavam diminuídas. Após o exame de mais alguns casos de leucemia, Virchow foi o primeiro que distinguiu com sucesso a leucemia esplênica e linfática (VIRCHOW, 1856).

A coloração tri-ácida desenvolvida Paul Erlich, em 1891, permitiu uma melhor visualização do núcleo e dos detalhes do citoplasma, sendo possível realizar a diferenciação morfológica das leucemias em linfóides e mielóides (ZAGO, 2014). Somente em 1924, Minot e Isaacs fizeram a primeira descrição detalhada dos achados clínicos da LLC, entretanto nada relataram sobre o curso clínico da doença (MINOT et al., 1924).

Uma importante revisão sobre os critérios para o diagnóstico da LLC foi publicada em 1966. Descreveram sobre a linfocitose, e importância do tratamento para aumento da sobrevivência dos pacientes além de sua possível toxicidade. Além disso, ressaltaram a importância de se avaliar trombocitopenia e anemia que ainda são critérios importantes no manejo desses pacientes (BOGGS, et al, 1966).

Na década de 70, com o desenvolvimento das técnicas de imunofluorescência direta, observou-se que nos indivíduos normais cerca de 7% das células do sangue periférico eram linfócitos B, enquanto que nos pacientes com LLC em média 89% das células correspondiam a linfócitos B (HAMBLIN, 2000).

Nos últimos anos, o aprimoramento da citometria de fluxo, da citogenética e estudos moleculares, permitiram um diagnóstico mais preciso da LLC e também foram de grande importância para o entendimento da imunopatologia da doença (HALLEK *et al.*, 2008; SWERDLOW *et al.*, 2016).

2.2 Leucemias

As leucemias são neoplasias que surgem a partir de células precursoras hematopoiéticas e possuem alta taxa de proliferação clonal que são originadas de células que sofreram mutações na sequência de bases do DNA, ou rearranjos cromossômicos com expressão inadequada de oncogenes, e /ou inibição de mecanismos de controle proliferativo. Essas neoplasias são ditas leucemias, quando se disseminam na medula óssea e invadem o sangue periférico. (FAILACE, 2009).

Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo dessas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia (INCA, 2014).

As estimativas para o ano de 2018, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) é que as Leucemias sejam o oitavo tipo de câncer mais incidente em homens e o nono entre as mulheres representando cerca de 2,8% e 2,7% dos casos respectivamente (INCA, 2017). Há um predomínio de homens em relação as mulheres. A maioria dos casos é relatada em pacientes com LLC que possuem a partir de 63 anos, sendo preponderante entre idosos. A sobrevida média é de 6 a 7 anos, podendo chegar a mais 10 anos (FARIA et al., 2000). Mundialmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, a predominância é parecida com a nacional, mantendo 11ª posição de câncer mais frequente em ambos sexos, representando aproximadamente 2,5 % de todos cânceres, excluindo melanoma e câncer de pele (FERLAY et al., 2014).

De uma maneira geral, as leucemias são subdivididas de acordo com as células progenitoras, dessa forma, elas podem ser de origem mieloide ou linfoide. Outra subdivisão bem ampla é feita, em agudas ou crônicas, de acordo com a evolução clínica e predomínio do estágio maturacional das células. Além disso, muitas revisões têm sido feitas pela OMS ampliando a paisagem genética /molecular de numerosas neoplasias linfóides e suas correlações clínicas. Levando em consideração as investigações que levam a estratégias terapêuticas mais direcionadas. No entanto, não é de interesse para esta revisão abordar tal extensa análise (J. BAIN, 2010; SWERDLOW *et al.*, 2016b)

2.2.1 Leucemia Linfocítica Crônica

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma desordem monoclonal cujo acúmulo progressivo de linfócitos funcionalmente incompetentes leva a uma linfocitose absoluta do sangue periférico. Nestes casos, observa-se a não responsividade à apoptose como principal causa dessa abundância celular (DIGHIRO et al,2005). Sabe-se que são predominantemente linfócitos B cuja linhagem, em 95% dos casos, expressa antígeno CD5 de maneira aberrante (SHANSHAL; HADDAD, 2012). A etiologia da LLC ainda é incerta, no entanto, vários fatores e biomarcadores associados a LLC já foram identificados (SHANSHAL, 2012). Há, no entanto, forte evidência de predisposição genética, uma vez que seu risco de desenvolvimento é

maior em algumas famílias. Sua prevalência também é maior entre trabalhadores expostos a agentes químicos e derivados de petróleo (YUILLE *et al.*, 2000).

O diagnóstico de Leucemia linfocítica crônica requer a presença de pelo menos 5×10^9 Linfócitos B / L no sangue periférico. A clonalidade dos linfócitos B circulantes precisa ser confirmada por citometria de fluxo. As células de leucemia encontradas no filme sanguíneo são caracteristicamente pequenas, linfócitos maduros com escasso citoplasma e um núcleo denso sem discernimento dos nucleolos e com cromatina parcialmente agregada. Sombras ou Manchas de Gumprecht, são outra característica encontrada na LLC (**Figura 1**). Nos pacientes sintomáticos, os achados mais comuns são a linfadenopatia generalizada, perda de peso, cansaço e infecções bacterianas, geralmente pneumonias. A hepatomegalia é detectada em metade desses pacientes, e a esplenomegalia geralmente não é volumosa. A infiltração leucêmica pode ocorrer em todas as partes do corpo, incluindo as tonsilas, meninges e pele. Com a progressão da doença, o paciente com LLC pode desenvolver anemia grave e sangramentos em decorrência da plaquetopenia, além do aumento progressivo de prolinfócitos, piora da esplenomegalia, enfartamento ganglionar e resistência ao tratamento (DIGHIERO, *et al*, 2005; HALLEK *et al*, 2008; WOYACH, 2018).

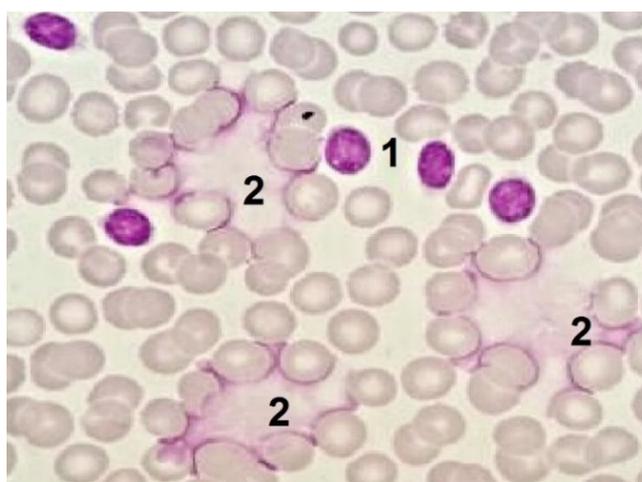


Figura 1- Campo de Leucemia linfocítica crônica (microscopia óptica). Observa-se linfócitos (1) e manchas de Gumprecht /sombras nucleares (2). Fonte: Almeida, Dauare T. (2016)

A avaliação do perfil imunofenotípico tornou-se imprescindível para o diagnóstico e a orientação terapêutica corretos. As principais características que definem a LLC

envolvem: a presença dominante de uma população de células B com seus principais marcadores CD19, CD20 e CD23; a presença do antígeno CD5 concomitante à ausência de outros marcadores de linfócitos T; e a monoclonalidade de células B com uma ressalva a expressão de ou imunoglobulinas de superfície Kappa ou Lambda de cadeia leve e essas células B caracteristicamente expressam outras imunoglobulinas de superfície (slg), CD79b, CD20 e CD22 com baixa intensidade (DIGHIERO, et al, 2005). Essas características costumam ser diferenciais para LLC em detrimento de outras desordens como leucemia prolinfocítica, tricoleucemia e linfoma de células do manto e outros linfomas. Visto que na leucemia prolinfocítica não há expressão de CD5 em metade dos casos e tipicamente tem elevada expressão de CD20 e Ig de superfície. Adicionalmente, leucemia e linfomas de células do manto apesar de expressarem CD5, geralmente não expressam CD23 (HALLEK *et al.*, 2008). A expressão de CD10 é negativa enquanto CD11c e CD25 é variável. FMC7 é raramente encontrado. Há expressão do CD38 e também CD23, CD25, CD27, CD69, CD71 e alta densidade de HLA-DR. Três marcadores são particularmente úteis no diagnóstico de tricoleucemia. As células pilosas apresentam forte expressão de CD11c e quase sempre são positivas para CD25 e CD103 (DA SILVA DUARTE, 2013).

Além do diagnóstico, as ferramentas da biologia molecular permitem prever a carga tumoral embora alguns deles não sejam recomendados para fim de avaliação de prognóstico na prática clínica etem sido associados a fisiopatologia da doença. O uso de técnicas de hibridização fluorescente *in situ*, conhecida como FISH (do inglês: *fluorescence in situ hybridization*), e outras técnicas de citogenética convencional permitem identificar casos de LLC em mais 80 % dos casos. As deleções mais comuns são do braço longo do cromossomo 13 [del(13q14.1)]; trissomia do cromossomo 12; deleção do braço longo do cromossomo 11 [del(11q)} ou do cromossomo 6 [del(6q)]; ou deleção do braço curto do cromossomo 17 [del(17p)] (DÖHNER, *et al.*, 2000; MAYR, et al, 2006). Em estudos retrospectivos, pacientes com LLC com as aberrações cromossômicas (11q) e (17q) demonstraram menor sobrevida em relação a del(13q) (DÖHNER, *et al.*, 1995; GREVER *et al.*, 2007). Pacientes com LLC com del(17q) parecem responder melhor a terapia com alentuzumabe, demonstrando a importância de análise citogenética

previamente a inserção de protocolos padrões de tratamento (LOZANSKI *et al.*, 2015).

Dentre os melhores biomarcadores de prognósticos estão a expressão de ZAP-70 e CD38, e o estado mutacional da região variável da cadeia pesada de imunoglobulinas (IgVH). De uma maneira geral, esses pacientes com esse gene de IgVH mutado possuem melhor prognóstico do que aqueles sem a mutação. A expressão de ZAP-70 e CD38 se correlacionam positivamente, no entanto a sua associação com o estado mutacional da IgVH não foi preponderante, permanecendo a necessidade de maiores validações e padronizações (THORSELIUS *et al.*, 2006; GREVER *et al.*, 2007; HALLEK *et al.*, 2008 SHAHJAHANI *et al.*, 2015).

Alguns biomarcadores sorológicos como CD23, Timidina quinase e β 2-microglobulina tem demonstrado potencial preditivo de sobrevivência e sobrevivência livre de progressão. No entanto ainda não existe um valor de referência validado para padronizar a utilização na prática clínica (SARFATI *et al.*, 1996; HALLEK *et al.*, 1999; MAGNAC *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2009).

O curso clínico da LLC é bastante variável, afinal trata-se de uma doença bastante heterogênea. Cerca de um terço dos pacientes com LLC nunca vão requerer tratamento, possuem uma sobrevida bem longa e acabam falecendo por outras causas não relacionadas a LLC. O outro terço tem uma fase inicial indolente, seguida de uma progressão da doença. O outro terço desses pacientes tem uma manifestação tão agressiva que o tratamento tem que ser iniciado o mais rápido possível (DIGHIERO, G., 2003). Essa realidade mostra que apenas diagnosticar não cria uma relação direta com a sobrevida dos pacientes com LLC, mas algumas manifestações clínicas foram melhor associadas a sobrevida como aumento absoluto de linfócitos no sangue periférico (BOGGS *et al.*, 1966). Foi assim que se percebeu a necessidade de parâmetros melhores para agrupar esses pacientes de maneira mais eficiente para adequação do estratégia terapêutica. Os dois sistemas mais utilizados atualmente na prática clínica são os sistemas de Rai (1975) e Binet (1981).

O sistema de estágio clínico proposto por Rai *et al.*, em 1975, considerava: i) linfocitose absoluta maior que $15.000/\text{mm}^3$ em sangue periférico associada ou não a adenomegalias, esplenomegalia e/ou hepatomegalia; ii) anemia definida como taxa

de hemoglobina menor que 11g/dl; iii) plaquetopenia definida como contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³. Esse sistema classificava os pacientes com LLC em 5 categorias de 0 a IV. Em 1987, esse sistema foi modificado pelos mesmos autores, e dividido em três categorias: baixo risco (estádio 0), de risco intermediário englobando os estádios I e II e alto risco, os estádios III e IV (**Quadro 1**) (RAI *et al.*, 2004).

Quadro 1-Sistema de estágio clínico por Rai et al (1987)

Estádio	Áreas comprometidas	Hb (g/dL)	Plaquetas/mm ³	Prognóstico
0	Nenhuma	>11,0	>100.000	Baixo risco
I e II	Linfonodos +Fígado e/ou baço	>11,0	>100.000	Risco Intermediário
III E IV	indiferente	<11,0	<1000.000	Alto risco

Hb= Hemoglobina.

Fonte: adaptado de(FERNANDES, 2016)

O sistema de estágio clínico de Binet et al (1981) subdivide os pacientes com LLC em três categorias. Os pacientes em estágio clínico A são considerados de baixo risco e clinicamente sem evidências de anemia ou plaquetopenia e com até duas cadeias ganglionares afetadas. Os pacientes em estágio clínico B diferem do grupo A, por apresentarem três ou mais cadeias ganglionares comprometidas e são consideradas de risco intermediário. Os pacientes classificados como estágio C apresentam anemia e plaquetopenia (**Quadro 2**) (BINET *et al.*, 1981)

Quadro 2-Sistema de estágio clínico por Binet et al 1981

Estádio	Áreas comprmetidas	Hb(g/dl)	Plaquetas/mm ³	Prognóstico
A	< 3 áreas	>10,0	>100.000	Baixo risco
B	= 3 áreas	>10,0	>100.000	Risco intermediário
C	indiferente	≤10,0	≤100.000	Alto risco

Hb= Hemoglobina.

Fonte: Adaptado de (FERNANDES, 2016)

Alguns estudos das últimas décadas estimaram que, aproximadamente 80% dos pacientes com LLC encontram-se no estágio A de Binet, enquanto na década de 70 esse percentual era de 40%. Essa mudança pode ter sido influenciada pela tendência de um diagnóstico cada vez mais precoce, incluindo a realização de exames de rotina em pacientes assintomáticos (MOLICA, S., 2000; ABRISQUETA *et al.*, 2009).

Os dois sistemas de estádios clínicos descritos por Rai *et al* (1987) e Binet *et al* (1981) são amplamente utilizados até hoje. Mas o seu valor prognóstico é limitado nos estádios precoces da doença (DIGHIERO,, 2003). Diante dessa realidade, vários estudos vem buscando a descoberta e/ou novas correlações de biomarcadores para suprir essa necessidade.

Alguns deles demonstraram, por exemplo, que o tempo de duplicação dos linfócitos (TDL) é um indicador prognóstico da LLC. Pacientes com o TDL inferior ou igual a 6 meses tem sobrevida menor comparado àqueles em que o TDL é superior a 12 meses e que apresentam sobrevida maior (MOLICA; ALBERTI, 1987).

Outros experimentos sugerem que os genes da família Bcl-2 também estão envolvidos na patogênese da LLC, pois atuam na seleção e manutenção de células B de memória de longa duração, resgatando-as da apoptose e levando ao seu acúmulo (SCHENA *et al.*, 1993). Os micro RNAs (miR) também estão nesse contexto, em particular o miR-15a e o miR-16-1, sendo envolvidos na proliferação celular e na apoptose uma vez que a redução de miR-15a e miR-16-1 reduz a apoptose via Bcl-2 (BRAGA *et al.*, 2017).

Esses dados sugerem que a descoberta e correlação de novos biomarcadores é essencial para maior elucidação e assertividade na terapêutica (GOMES *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Abordagens terapêuticas

Embora a LLC tenha uma baixa taxa de mortalidade, esta doença geralmente não é considerada curável atualmente. O tratamento envolve agentes alquilantes e glucocorticóides, análogos de purina, terapias de anticorpos monoclonais e transplante de medula óssea.(GOMES *et al.*, 2018)

O grupo alquil dos agentes alquilantes se liga de forma covalente a sítios nucleofílicos celulares, resultando em ligações cruzadas de DNA e citotoxicidade celular. O clorambucil e ciclofosfamida são exemplos de agentes quimioterapêuticos dessa classe e podem ser utilizados com ou sem glicocorticóides associados. Geralmente são utilizados no tratamento inicial da LLC. (BEGLEITER *et al.*, 1996; VYAS N, 2012)

Entre os análogos de purina utilizados como primeira ou segunda linha de tratamento (fludarabina, pentostatina e cladribina), a fludarabina é a mais amplamente utilizada. A fludarabina foi sintetizada para desenvolver análogos de citarabina mais ativos. Ela é convertida em fludarabina-ara-ATP dentro da célula onde compete com dATP para incorporação no DNA. O seu mecanismo de ação consiste na inibição da replicação do DNA por inibição da DNA polimerase, ribonucleotideo redutase, DNA ligase e DNA primase (RICCI *et al.*, 2009; ROBAK, 2005).

Os anticorpos monoclonais utilizados no tratamento de LLC são divididos em grupos com base em proteínas alvo. Alguns desses anticorpos (rituximab, ofumumab e obinutuzumab) visam o antígeno CD20, enquanto o alemtuzumab possui como antígeno alvo CD52, todas proteínas encontradas na superfície dos linfócitos B. O mecanismo de ação do rituximab que diminui a proliferação de células da LLC ocorre por ativação da citotoxicidade dependente do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpos ou por indução de apoptose. Alemtuzumab por sua vez , induz a citotoxicidade celular por anticorpos ou resposta mediada pelo complemento (GOMES *et al.*, 2018; HALLEK, 2017).

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (alloHCT) é considerado um tratamento capaz de alcançar progressão livre da doença mais duradoura,

especialmente nos pacientes com LLC que conseguem negatividade no exame de doença residual mínima. O efeito do AlloHCT é melhor quando realizado em pacientes com doença responsiva, enquanto a maioria dos estudos relatam esse resultado não é influenciado pela presença de anormalidades citogenéticas ou moleculares de alto risco incluindo mutações del (17p). A principal desvantagem de alloHCT é a ocorrência de mortalidade devido a infecção ou a ocorrência de doença de enxerto versus hospedeiro, que acontecem mais frequentemente nos dois primeiros anos de transplante. (VAN GELDER *et al.*, 2017)

2.2.3 Vesículas extracelulares

Um microambiente de apoio ao tumor contribui para o desenvolvimento e progressão da LLC (BURGER, 2011). No entanto, ainda há muito a ser entendido em relação à variedade de interações entre células e os outros fatores, carcinogênicos ou não, nesse microambiente, tornando-se necessário considerar também outros meios descritos de comunicação celular como vesículas extracelulares (VEs).

Evidências convincentes apontam o papel das microvesículas em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos. Atualizações nesta área desafiam paradigmas atuais sobre os mecanismos de comunicação intercelular e regulação imune. Além disso, sua implementação clínica pode abrir novas perspectivas em medicina translacional tanto no diagnóstico como na terapia de várias patologias, dentre elas a LLC (GYÖRGY *et al.*, 2011).

As vesículas extracelulares podem interagir com células alvo através de receptores de membrana e, assim, levar à ativação de cascatas de sinalização intracelular, bem como reprogramar células alvo através da transferência de moléculas de RNA e proteínas (RATAJCZAK, *et al.*, 2009). Na tumorigênese, as VEs derivadas de células cancerígenas são importantes mediadores do crescimento tumoral, evasão imunológica, angiogênese e metástase (**Figura 2**) (MURALIDHARAN-CHARI, *et al.*, 2010). Por conseguinte, um número aumentado dessas vesículas foram detectados no plasma sanguíneo de pacientes com LLC em estágio de doença avançada e uma estimulação mediada por vesículas de células estromais de medula óssea também foi demonstrada (GHOSH *et al.*, 2009; HADERK *et al.*, 2013).

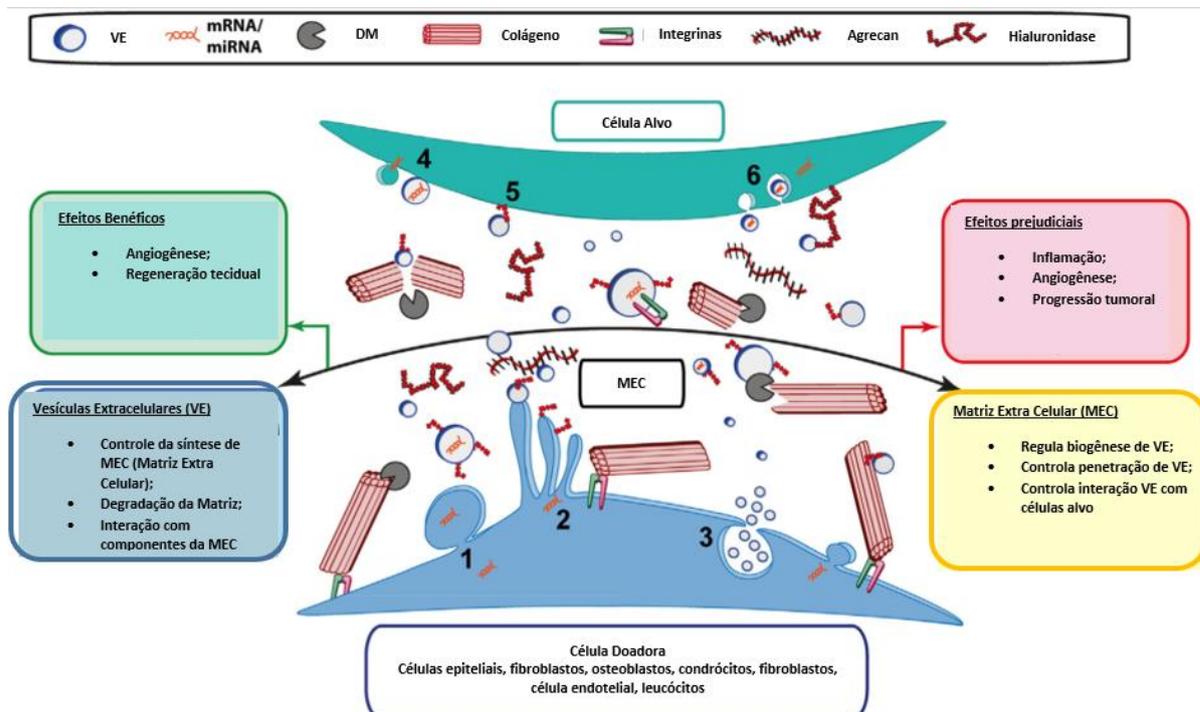


Figura 2 –Vesículas extracelulares como componentes moduladores da matriz extracelular. Impacto das VE sobre vários processos celulares e teciduais em saúde e doenças. Brotação direta de VE da membrana plasmática (1) ou suas protrusões (2), ou pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática (3). Eles interagem com as células alvo por fusão direta (4), interações receptor-ligante (5) ou endocitose (6). A comunicação direta e indireta entre VE e MEC (setas pretas) tem múltiplos efeitos benéficos e prejudiciais sobre células e tecidos alvo. Fonte: extraído e adaptado de (RILLA et al., 2017)

Atualmente, as VEs são geralmente classificadas em três categorias principais, com base em seu mecanismo de biogênese: exossomos (30-100 nm de diâmetro), microvesículas (ou micropartículas, 100 a 1000 nm) e corpos apoptóticos (1-5 μ m) (**Quadro 4**). No entanto, esses diâmetros se sobrepõem, o que dificulta a separação simples de diferentes subgrupos (**Figura 3**). Por isso VEs é o termo geral usado para cobrir todas as categorias mencionadas acima (RILLA et al., 2017).

A sociedade internacional para vesículas extracelulares (ISEV) definiu em 2012 os quatro princípios básicos para assumir que se trabalha com VEs: escolher os termos com base no argumento precedente e lógico e aplicá-los de forma consistente ao longo do trabalho; definição clara do método de obtenção da amostra geral e obtenção das VEs; revisores e editores devem respeitar a liberdade

científica dos autores em sua escolha de nomenclatura vesicular, desde que siga precedente, lógica e os dados dos autores; e, como último princípio, recomenda-se o uso de experimentos complementares, por exemplo, centrifugação de gradiente de flotação com densidade de sacarose, microscopia de luz e microscopia eletrônica (GOULD; RAPOSO, 2013).

Há fortes evidências da diferente constituição dessas VEs. Alguns marcadores sendo mais predominantes em algumas distribuições de tamanho, como propôs Kowal et al., (2016), que actina-4 seria o melhor biomarcador para VEs de tamanho médio.

Quadro 4- Principais características das populações de vesículas extracelulares

	Exossomos	Micropartículas	Corpos apoptóticos
Intervalo de tamanho	30-100 nm	100-1.000 nm	1-5 μ m
Mecanismo de biogênese	Exocitose de corpos multivesiculares	Brotamento a partir da membrana plasmática	Liberação a partir de brotamentos de células em apoptose

Fonte: adaptado de (GYÖRGY et al., 2011)

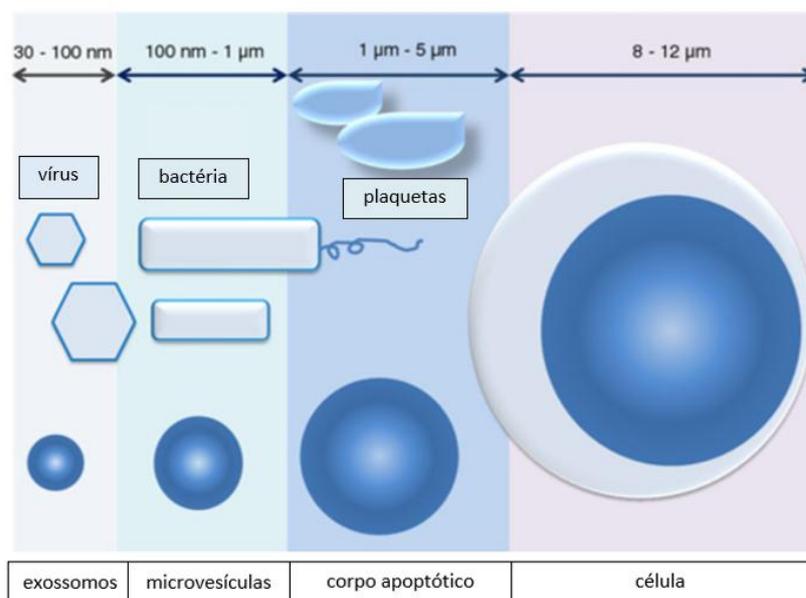


Figura 3- Faixas de tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares membranares. Fonte: adaptado de (GYÖRGY *et al.*, 2011)

A biogênese dos exossomos ocorre através da via endocítica. Quando um endossoma inicial amadurece em um endossoma tardio, vesículas intraluminais (VIL) sofrem invaginações dentro do endossoma, formando uma estrutura chamada corpo multivesicular (MVE). Este corpo multivesicular pode ser degradado em lisossomos ou se fundir com a membrana plasmática e liberar as VIL para o espaço extracelular. Após este lançamento, VIL são chamados de exossomos (**Figura 4**) (HURLEY, *et al.*, 2010). Uma alta taxa de secreção de exossomos de células transformadas sugere que o equilíbrio entre esses dois processos no câncer é deslocado para liberação de carga exossômica (BEBELMAN *et al.*, 2018).

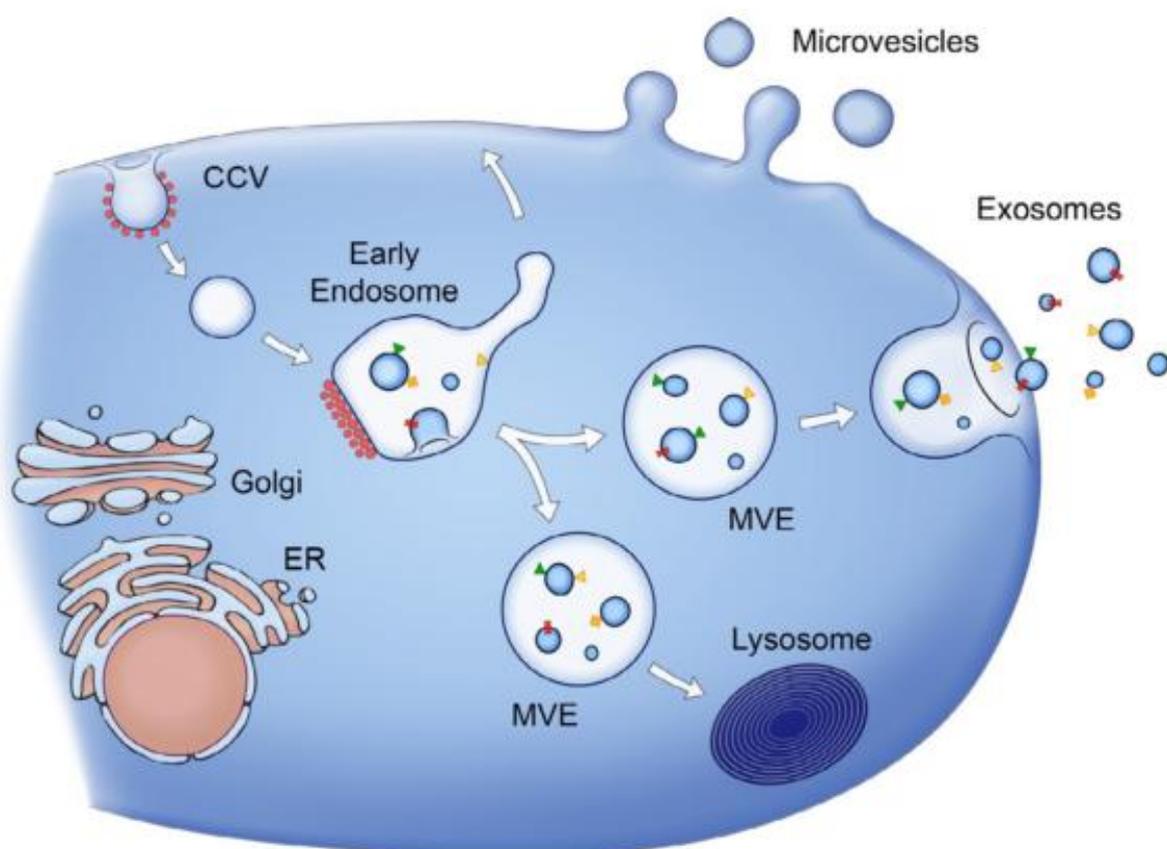


Figura 4- Liberação de micropartículas e exossomos. As MP(microvesículas) brotam diretamente da membrana plasmática, enquanto os exossomos (exosomes) são representados por pequenas vesículas de tamanhos diferentes que são formadas como VIL por brotamento em endossomos iniciais (Early endosome) e MP e são liberadas pela fusão de MP com a membrana plasmática. Outras vesículas podem se fundir com os lisossomos(Lysosome) . O ponto de divergência entre esses tipos de vesículas é estabelecido nos endossomos iniciais. Manchas vermelhas simbolizam a clatrina associada a vesículas na membrana plasmática ou camadas de clatrina em endossomos. As proteínas associadas à membrana e transmembrana nas vesículas são representadas como triângulos e retângulos, respectivamente. Setas representam direções propostas de transporte de proteínas e lipídios entre organelas e entre MP e a membrana plasmática para secreção de exossomos. Fonte: (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Para outros tipos VEs, como micropartículas (MP) e corpos apoptóticos, assume-se que se formam através de brotamento direto da superfície celular ou de suas protrusões. O mecanismo está relacionado à ativação da composição fosfolipídica dos folhetos internos e externos da membrana plasmática por *flipases* e *floppases*, resultando em fosfatidilserina (PS) sendo transferida para o folheto externo. Em condições de repouso, os fosfolípidos são distribuídos assimetricamente na membrana de células eucarióticas. O folheto exterior é enriquecido em fosfatidilcolina e esfingomiéline, enquanto que o folheto interno contém os aminofosfolípidos PS e a fosfatidiletanolamina. A distribuição dos lipídios da

membrana é o resultado de um processo ativo sob a dependência de transportadores de fosfolípidos complementares que governam a translocação para dentro (*flip*) ou para o exterior (*flop*). A apresentação de PS ou fosfatidiletanolamina no folheto externo resulta em um transporte de volta para o folheto interno por uma translocase de aminofosfolípídios com atividade "*flippase*" que mantém a distribuição normal de fosfolípídios em repouso. Como o transporte transmembranar não catalisado é lento, a assimetria lipídica é estável em células quiescentes. Foi sugerido que uma "*floppase*" (ou seja, uma proteína dependente de ATP que transfere especificamente PS do interior para o folheto externo) medeia a translocação externa rápida que é diretamente responsável pela interrupção da assimetria quando as células são ativadas. Além disso, uma translocadora bidirecional de lipídios não específico - que é ativado por um influxo de íons de cálcio - permite que todos os fosfolípidos fluam para sentido diferente de seus gradientes de concentração, favorecendo a randomização. A exposição de PS é a consequência da rápida translocação esmagadora exercida por *floppase(s)* e a inibição da atividade de *flippase* por influxo de cálcio. O desequilíbrio transitório de fosfolípidos entre os 2 folhetos, devido à randomização da membrana e a proteólise do citoesqueleto promovido por calpaínas ativadas pelo cálcio, promovem a liberação de MPs. A exposição a PS tornou-se uma característica quase universal de células submetidas a ativação ou apoptose e uma característica subjacente comum da liberação de MP por estas células (**Figura 5**) (MOREL, et al, 2011).

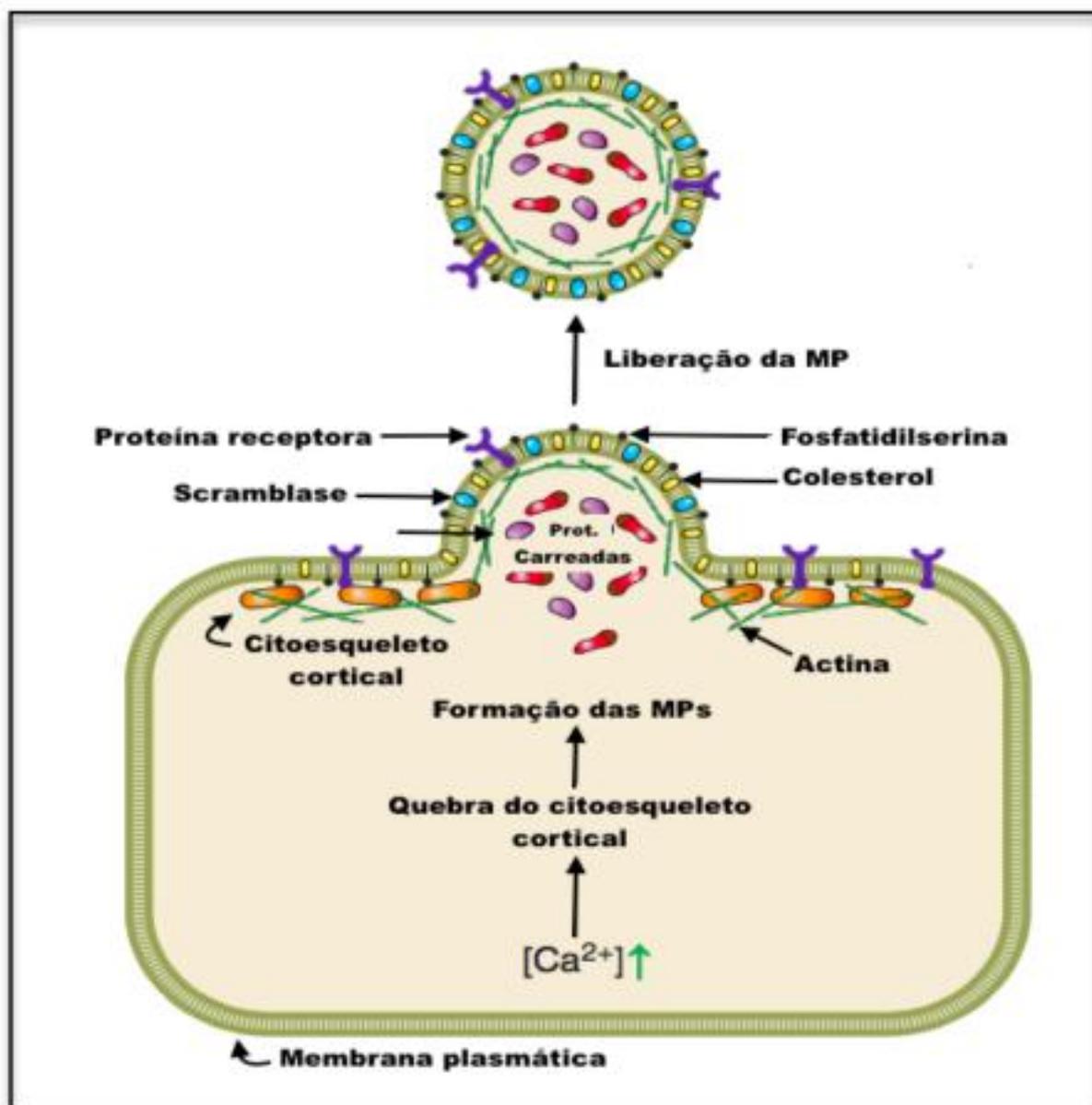


Figura 5 - Representação do processo de formação das micropartículas extracelulares (MPs). A célula progenitora após receber o estímulo sofre aumento do cálcio intracelular favorecendo a quebra do citoesqueleto cortical, evento essencial para a externalização da fosfatidilserina com formação das micropartículas derivadas da membrana plasmática celular. Fonte:(MARTINS, 2017). Adaptado de (TURTURICI, 2014).

Os corpos apoptóticos são vesículas contendo os restos de citoplasma e as organelas da célula que entrou em apoptose. No começo do processo apoptótico, a célula perde as suas microvilosidades e proteínas de adesão. Em seguida, há um encolhimento do citoplasma e uma grande redução na sua motilidade, aí então a membrana perde a sua assimetria, de modo que a fosfatidilserina fica exposta e

finalmente, a célula se desmembra em corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos apresentam marcadores de superfície que os levam a ser fagocitados, o que inclusive evita uma resposta inflamatória (POLLARD; EARNSHAW, 2006; WILLMS *et al.*, 2018)

As vesículas extracelulares podem influenciar o microambiente tumoral a favor da progressão da LLC, desde a modulação do estroma medular na produção de linfócitos B na LLC, até mesmo indução da apresentação de perfis proteicos diferentes pelas células. A fusão das VEs com as células pode envolver a transferência horizontal de proteínas, mediando assim mudanças fenotípicas nas células alvo, assim como já foi relatada a preservação de receptores alvos de fármacos nas VEs. Nesse caso, a preservação dos receptores foi associada à evasão a alguns tratamentos, pois as VEs atuariam como aceptores, mas sem distribuir o fármaco eficientemente às células. Similarmente, pode-se considerar a capacidade das VEs de transferir ligantes ativos que manteriam o seu potencial de indução de resposta intracelular. Essa resposta intracelular por sua vez poderia ser direcionada em dois sentidos: no sentido da proliferação – elucidando mais um mecanismo de ancoramento anti-apoptótico das células leucêmicas-, ou mesmo no sentido de manutenção da habilidade citotóxica- tornando-se potencial mecanismo de tratamento. Além dessa mudança fenotípica por transferência direta, há a mudança através da expressão de fatores carregados por RNAs pelas VEs(MARTÍNEZ-LORENZO; *et al.*, 1999; MIGUET *et al.*, 2009; BROOKS *et al.*, 2010; HADERK *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2015).

Ademais, como o tratamento pode influenciar na caracterização, conteúdo e distribuição dessas VEs ainda são de grande interesse. Por exemplo, já se tem noção que Fludarabina e Cladribina induzem alterações nas proteínas de superfície em linhagens de células linfóides humanas B. Essas alterações incluem diminuições no CD22 (uma molécula de adesão e sinalização) e aumentos no CD205 (um “marcador de célula “danificada”) e CD80 e CD50 (moléculas de interação de células T). Os análogos de purina podem afetar as moléculas de sinalização e co-estimuladoras do receptor de células B (BCR), conduzindo a múltiplos sinais para apoptose e eliminação celular. A fludarabina e a cladribina induzem efeitos diferenciais, com algumas proteínas de sobrevivência celular (ECE-1 e CD100) mais abundantes após o tratamento com fludarabina. (KOHNKE, *et al.*, 2012)

Raras são as descrições desse perfil fenótipo proteico das VEs. Mais incomuns ainda são as avaliações de mudanças desses fenótipos e seu conteúdo de acordo com sistemas de classificação clínica ou sob influência de algum quimioterápico.

2.2.4. CD3 e a evasão imune

Pacientes com LLC frequentemente apresentam distúrbios imunológicos. Além disso, novas evidências estão surgindo sobre o papel das células T na patogênese e desenvolvimento de vários cânceres. O papel central desempenhado pelos linfócitos T no controle da progressão do crescimento tumoral tem sido amplamente aceito. No entanto, ainda não está claro por que as células T são incapazes de exercer este controle com sucesso na maioria dos casos de malignidade, e o não reconhecimento do tumor pelo sistema imunológico do hospedeiro permanece um dos problemas não resolvidos da imunologia. (WHITESIDE, 2004;UPRETI *et al.*, 2016;)

O complexo do receptor de células-T (TCR) é um receptor octamérico composto por duas cadeias, $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$, que se ligam a ligantes específicos, um peptídeo antigênico apresentado no complexo maior de histocompatibilidade. Essas cadeias estão associadas de forma não covalente às subunidades CD3, composta por quatro proteínas transmembranas denominadas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ e CD3 ζ . A ligação dos receptores antigênicos aos seus ligantes induz a fosforilação da tirosina de inúmeras proteínas que acabarão por conduzir a uma resposta funcional. Dentre as tirosino cinases envolvidas na transdução da sinalização do TCR está a ZAP-70 que encontra-se associada à cadeia ζ do CD3. A ausência da cadeia CD3 ζ não só influencia a expressão de TCR na membrana celular e o número de células T CD4+ e T CD8+, mas também prejudica a resposta proliferativa e o nível de ativação de células T maduras. (HUANG *et al.*, 2012)

Estudos recentes mostraram um padrão de expressão anormal desses quatro genes de CD3 em leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC) e pacientes com mieloma múltiplo (MM)(CHEN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; UPRETI *et al.*, 2016)

3- JUSTIFICATIVA

A mediana de sobrevida dos pacientes com LLC é de 10 anos, no entanto, o prognóstico é bastante variável, e alguns evoluem com curta sobrevida (DE FARIA et al., 2000; HALLEK, 2008;). Os sistemas de estadiamento, Rai e Binet possuem aplicação fácil na prática clínica, mas as variações evolutivas individuais não podem ser previstas (BRAGA *et al.*, 2017). Esse contexto tem conduzido à investigação de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, prognóstico e conduta terapêutica nestes pacientes.

Dados recentes do grupo (ainda não publicados), mostraram diferença significativa na quantidade de VEs em pacientes com LLC quando comparado com grupo controle constituído por indivíduos saudáveis. Isso motivou a estudar os linfócitos de uma maneira mais incisiva com cultura de PBMC de sangue total em que normalmente tem-se cerca de 85% constituído por linfócitos (ABBAS, et al, 2008). Dada a característica de que as VEs circulantes detêm a capacidade de transferir seu conteúdo vesicular às células de outros tecidos, avaliar as características do perfil de VEs tornou-se um relevante questionamento. Ainda, considerando o quadro de imunodeficiência apresentada pelos pacientes com LLC, o carreamento dos genes de CD3 por estas VEs e sua expressão nas células de origem foi outro ponto de investigação considerado. A hipótese de estudo foi que os pacientes com esta doença e os indivíduos controle estariam associados a um perfil de VEs diferentes, e que o tratamento seria capaz de modificar esse perfil também. Ademais, investigar uma possível associação das VEs com expressão anormal dos genes das cadeias do CD3 na LLC. Dessa forma, acredita-se que o desenvolvimento do presente estudo possa agregar algum conhecimento aos pré-existentes acerca da fisiopatologia e prognóstico da LLC, ajudando a elucidar a importância: das diferenças dos perfis de VEs, das diferenças qualitativas das VEs; do potencial de carrear mRNAs dos componentes da cadeia TCR/CD3 no contexto do comprometimento imune; e impacto do tratamento na LLC no perfil destas VEs.

Além do mais, a procura constante por novos biomarcadores para a identificação precoce dos pacientes com LLC recém diagnosticados que evoluirão rápida e

desfavoravelmente é de suma importância, considerando a possível adoção de condutas terapêuticas mais adequadas e eficazes em tais pacientes

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Caracterização das vesículas extracelulares e expressão das cadeias do complexo TCR/CD3 em pacientes com leucemia linfocítica crônica.

4.2-Objetivos Específicos

4.2.1- Avaliar o perfil de distribuição de tamanho das VEs;

4.2.2- Avaliar perfil imunofenotípico das VEs

4.2.3- Avaliar a interferência do tratamento com fludarabina na distribuição e conteúdo das VEs;

4.2.4- Avaliar expressão dos genes das cadeias do complexo TCR/CD3 em pacientes com LLC e grupo controle;

4.2.5- Avaliar a capacidade das VEs de carrear e alterar expressão dos genes das cadeias do complexo TCR/CD3;

4.2.6- Avaliar qualitativamente o perfil proteico de VEs dos pacientes com LLC antes e após a exposição à fludarabina;

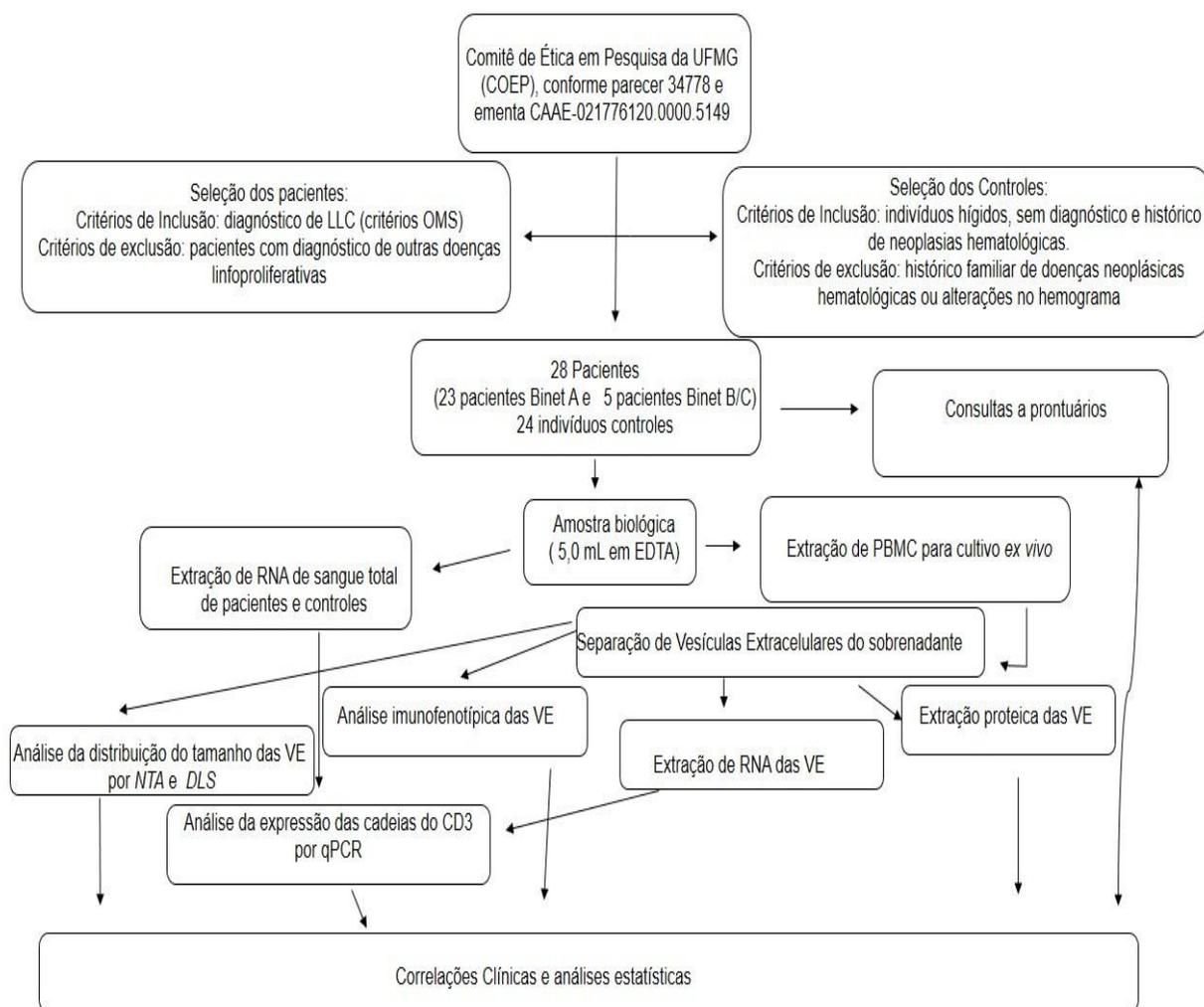
4.2.7- Relacionar os dados obtidos pelas análises moleculares com os parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com LLC

4.2.8- Realizar estudos de comparação e correlação entre todos os parâmetros avaliados.

5-MATERIAIS E MÉTODOS.

5.1 Delineamento experimental

Para um melhor entendimento do delineamento experimental, encontra-se abaixo um fluxograma com todas as etapas do presente estudo.



O presente estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**) foram aprovados sob o ponto de vista ético e formal pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), conforme parecer 34778 (**Anexo 2**) e ementa CAAE-021776120.0000.5149 (**Anexo 3**). Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki (“World Medical Association Declaration of Helsinki”, 2013).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara e destacando-se a participação voluntária foi realizado com os pacientes com LLC e seus familiares envolvidos no estudo, durante o período de coleta das amostras. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtida no momento da coleta de sangue. Os dados clínicos e laboratoriais desses pacientes foram obtidos a partir das anotações nas fichas clínicas, além de informações contidas no sistema computadorizado e prontuários arquivados no hospital

5.2 Casuística

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Setor de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Ambulatório Borges da Costa, para a coleta de amostra biológica que ocorreram entre abril de 2017 e agosto de 2017. Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de LLC, atendidos no período descrito acima e que aceitaram participar do estudo. A realização desta pesquisa não interferiu em nenhuma conduta clínica ou terapêutica. O cálculo amostral foi baseado na população de pacientes com LLC que estão sob acompanhamento ativo por este centro de atenção. Sendo aproximadamente 100 pacientes e considerando 90% de nível de confiança, o número mínimo seria de 25 pacientes.

O diagnóstico foi realizado através de avaliação clínica, hemograma e imunofenotipagem. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a classificação de Binet: Binet A: 23 pacientes Binet B+C: 5 pacientes

O grupo controle foi composto por 24 indivíduos saudáveis, moradores da comunidade em geral e nível sócio-econômico similar aos pacientes com LLC, doadores voluntários de sangue periférico, com idade média de 66,2 anos (faixa etária 51-80 anos); 12 do sexo masculino e 12 do sexo feminino.

5.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de LLC selecionados por médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, de acordo com critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estadiamento da LLC pela Classificação do Grupo de Trabalho Internacional (Binet) (SWERDLOW *et al.*, 2016b). Para o grupo controle foram incluídos indivíduos aparentemente hígidos, sem diagnóstico e história de neoplasias e outros distúrbios hematológicos. Para maior confiabilidade foram feitos hemogramas desses indivíduos, cujos resultados se mostraram dentro dos valores de referência.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outras doenças linfoproliferativas como Leucemia prolinfocítica, Leucemia de células pilosas, Linfoma esplênico com linfócitos pilosos e Leucemia plasmocítica, além dos Linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Para o grupo controle, foram excluídos os indivíduos com histórico familiar de doenças neoplásicas hematológicas e com alterações significativas no hemograma.

5.3 Amostra biológica

Foi coletada, de cada paciente com LLC amostra de sangue periférico em tubo do sistema Vacutainer em EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2), sendo 5,0 mL no total. O mesmo procedimento realizado no grupo de pacientes com LLC foi realizado no grupo controle. As amostras foram transportadas em maleta apropriada para transporte de material biológico entre 5 e 8° C, tendo sido as amostras processadas o mais rápido possível no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os hemogramas, para o grupo controle, foram realizados pelo sistema automatizado (T890 Coulter-Analisador Hematológico). Antes de qualquer processamento das amostras, uma alíquota dessa amostra de sangue total foi separada para extração de RNA e, posteriormente, as células foram utilizadas para

realização da técnica de separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O sobrenadante do cultivo celular foi dividido em alíquotas de 600µl e armazenado em freezer à -80°C.

5.4 Preparo do banco de dados

As fichas clínicas dos pacientes com LLC foram parcialmente preenchidas no ato da coleta de sangue, com os dados pessoais desses pacientes por autorrelato e, posteriormente, os prontuários foram consultados para a obtenção de dados da evolução clínica, desde a data do diagnóstico até o momento da coleta de sangue. Os parâmetros coletados foram utilizados para elaboração de um banco de dados, com informações relativas à idade, sexo, data do diagnóstico, classificação de Binet, hemograma realizado há no máximo 2 meses antes da coleta e informações sobre realização de tratamento quimioterápico e para outras comorbidades antes da coleta.

5.5 Métodos

5.5.1 Obtenção e cultivo de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC)

Para obtenção e cultivo de PBMC foi seguido o manual do FICOLL® (Ficoll® Paque Plus-SIGMA-ALDRICH (Califórnia-EUA)). O sangue coletado foi diluído no mesmo volume de PBS 1X autoclavado. O sangue foi transferido para um tubo FALCON novo de 50 ml. O PBS 1X foi adicionado ao tubo FALCON que contém o sangue mantendo diluição 1:1 (volume/volume). O gradiente para a centrifugação foi preparado utilizando uma quantidade de FICOLL® (Ficoll® Paque Plus-SIGMA-ALDRICH) igual à do sangue coletado. Adicionou-se 10 mL de FICOLL® em um tubo FALCON novo de 50 mL e, com o auxílio de uma pipeta 20 mL, adicionou-se o sangue diluído ao tubo que contém FICOLL® bem devagar e com bastante cuidado. Essa mistura do sangue com gradiente de FICOLL® foi contrifugada a 193 x g rpm, por 40 minutos, à temperatura ambiente (20°C) sem desaceleração forçada da centrífuga. A camada superior (plasma rico em plaquetas) foi descartada com o auxílio de uma pipeta. Foi deixado aproximadamente 1cm de plasma acima da

interface plasma/PBMC. A camada de PBMC foi coletada com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, essa camada de PBMC foi transferida para 2 novos tubos FALCON de 50 ml. Completou-se o volume de cada tubo FALCON contendo PBMC para 45 mL com PBS 1X para lavar as células, esse volume foi centrifugado a 302 x g, por 10 minutos a 4°C. O pellet de cada tubo foi ressuspensionado com cuidado, e a etapa anterior foi repetida para lavar as células.

Para cultura dessas células foram utilizadas 1×10^6 células por poço em placas de 6 poços. Foi utilizado, em cada poço, qsp 2 mL de meio RPMI com 20% de Soro Fetal Bovino (Sigma-Aldrich, EUA) ultracentrifugado a 100.000g por 180 minutos a 4°C.

5.5.1.1 Determinação da viabilidade das células

Diluiu-se as células 1:20 em corante Azul de Trypan (190 μ L de Azul de Trypan +10 μ L de solução de células) para a contagem em hemocitômetro por 8 dias para determinação da viabilidade celular das células de PBMC de pacientes com LLC em cultura. A curva de sobrevivência é importante para justificar o uso dessa população celular, mostrando que a morte celular provocada pelo fármaco é realmente significativa.

5.5.1.2 Avaliação Da IC50 Da Fludarabina

Para avaliar a atividade citotóxica da fludarabina (Fosfato de Fludarabina, Sigma Aldrich (Saint Louis, MO-EUA) foi utilizado o método de citotoxicidade, no qual, consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células permanecem vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) levando a redução desta molécula para originar o azul de formazam. A leitura da quantidade de azul de formazam formado foi medida por espectrofotometria em 550 nm (Espectrofotômetro SpectraMax Plus – Molecular Devices, EUA). As PBMCs foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 5×10^6 células por poço, tratadas com concentrações

crescentes de fludarabina diluída (100; 10; 1; 0,1 μM) no mesmo meio de cultura por um período de 48h. Em seguida, 20 μl do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e após três horas a 37 °C, DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazam. As absorbâncias foram lidas em 550 nm e a concentração que inibe 50% o crescimento das células (IC50) na presença de fludarabina foi determinada em comparação com células cultivadas sem o fármaco (consideradas 100% de crescimento). O IC50 foi calculado, para tratamento com fludarabina em células(de PBMC) *ex vivo* leucêmicas, por programa OriginPro8.

5.5.2 Separação das vesículas extracelulares (VEs)

Após 48 horas de cultivo celular *ex vivo* de PBMC, todo conteúdo da cultura foi submetido a centrifugação a 302 x g por 10 minutos para separação do conteúdo celular do sobrenadante da cultura e foi congelado a -80°C até sua utilização. Essas amostras de sobrenadantes então foram centrifugadas à 1552 x g por 15 minutos a 15°C. 200 μl de sobrenadante foram coletados e colocados em um tubo novo contendo 600 μl de solução de citrato- heparina (diluição 1:3). Esta solução de citrato-heparina para separação das VEs foi baseada na técnica de Campos et al., (2010) e está descrita no **Quadro 5**. Então, essa mistura de sobrenadante e tampão citrato-heparina foi centrifugada a 1800x g por 90 min a 15°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido e descartado deixando 50uL finais nos quais estariam as VEs.

Quadro 5- Tampão de separação de vesículas extracelulares

<u>Reagente</u>	<u>Volume</u>
Heparina 5000U/L	2uL
Citrato (3,4%)	500uL
PBS filtrado	qsp 5mL

Para as amostras que foram submetidas à extração de RNA, foram realizadas duas centrifugações a 1552 xg por 15 minutos a 15°C em vez de apenas uma, a fim de retirar interferência de corpos apoptóticos na análise.

5.5.2.1 Análise Da Distribuição Do Tamanho Das VEs (Por Dispersão Dinâmica De Luz- DLS)

O tamanho das VEs foi determinado no aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), usando o método de espalhamento dinâmico de luz (DLS), com faixa nominal de medição de 0,3-10,000 nm. Flutuações de intensidade de luz, devido aos movimentos brownianos das partículas, permitiram a determinação de sua velocidade média, que por sua vez foi recalculada em tamanho efetivo de partícula. Amostras foram diluídas 1:4 para análise.

5.5.2.2 Análise Da Distribuição Da Quantidade Das VEs (Por Análise De Rastreamento De Nanopartículas- NTA)

A concentração das VEs foi estimada no aparelho NanoSight LM10, para quantificação em amostras relativamente polidispersas. As amostras foram diluídas 1:100 em PBS para análise. Sua análise de tamanho se baseia no movimento browniano, conforme **Figura 6**. A análise de tamanho é realizada para cada partícula individualmente, sendo determinado o coeficiente de difusão por meio da equação de Stokes Einstein que permite calcular o raio hidrodinâmico.

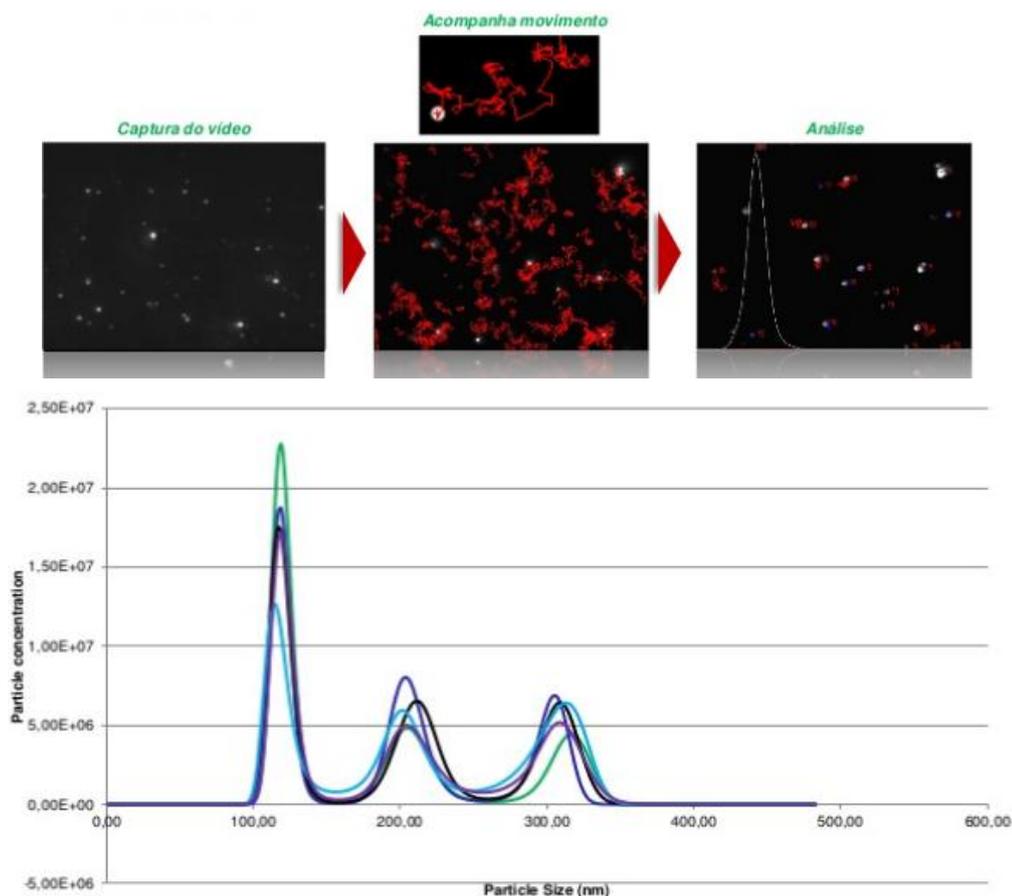


Figura 6- “Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): Contagem visualização e análise de tamanho de partículas”. (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2014)

5.5.2.3 Imunofenotipagem Das Vesículas Extracelulares Por Citometria De Fluxo.

As VEs foram analisadas por citometria de fluxo e a presença de micropartículas no sobrenadante do cultivo *ex vivo* de *PBMC*, foi confirmada por meio do uso de microesferas fluorescentes (Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, EUA) de tamanho definido (0,7 a 0,9 μm) (**Figura 7**). Dez microlitros das microesferas foram adicionadas à 100 μl de PBS 1X estéril. O citômetro foi ajustado para realizar a leitura das amostras a uma velocidade de (60 $\mu\text{l}/\text{segundo}$) para cada amostra. Como controle negativo da marcação foram utilizados anticorpos isotipo IgG de camundongo marcados com APC, PE e FITC (BD Pharmingen Mouse IgG controls) (**Figura 8**). Foi utilizado 5 μl de anticorpos da marca Immunotools (Friesoythe, Alemanha) para os ensaios. Após a adição de anticorpos anti-CD14 (APC) para

identificar VEs de origem monocítica; anti-CD19 (PE) para VEs de origem linfocitária; e de Anexina V(FITC) para identificação geral das VEs por marcação da fosfatidilserina, as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz e em temperatura ambiente. Após a incubação, as VEs foram ressuspensas em 300 μ l do tampão de ligação de Anexina V (BD Pharmingen). As amostras foram levadas ao citômetro de fluxo (LSR Fortessa - Becton-Dickinson, California, EUA). As análises dos resultados foram realizadas com a utilização do programa FlowJo, versão 8.7 (Tree Star). As estratégias de análises estão representadas na **Figuras 9**. As VEs foram analisadas de acordo com seu tamanho e sua complexidade, sendo *forward scatter* (FSC) versus *side scatter* (SSC), respectivamente, com distribuição de dispersão comparada a microesferas sintéticas fluorescentes de tamanho definido, 0,7 μ m 0,8 μ m e 0,9 μ m (Amino Fluorescent Particles - Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, EUA) para auxiliar a identificação das populações das vesículas extracelulares avaliadas

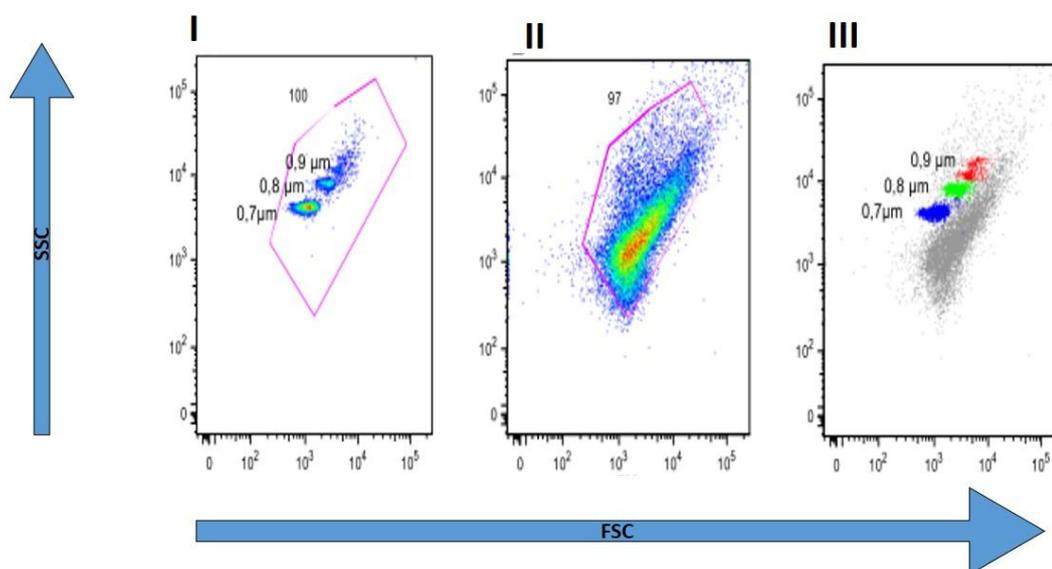


Figura 7 --Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares celulares (VEs).I:Identificação da região contendo as populações de microesferas sintéticas de tamanho definido (0,7 μ m 0,8 μ m e 0,9 μ m); II: Definição da região contendo as

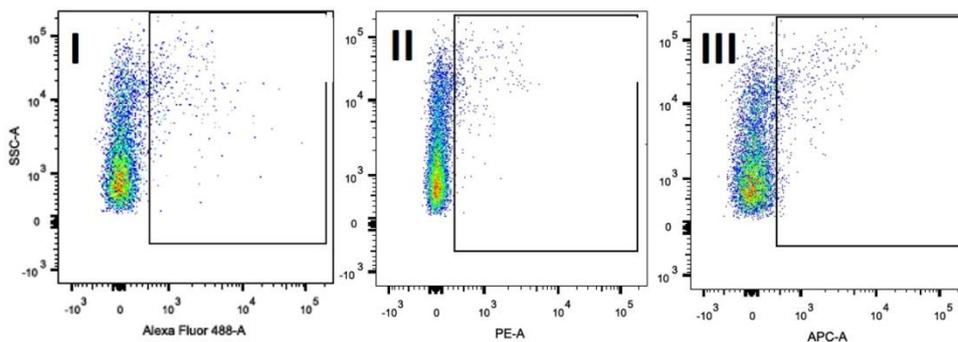


Figura 8-Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares (VEs) para controle de isotipos. Complexidade (SSC-eixo vertical) por fluorescência (Eixo horizontal) I: Controle de isotipo FITC; II: Controle de isotipo PE; III: Controle de isotipo APC

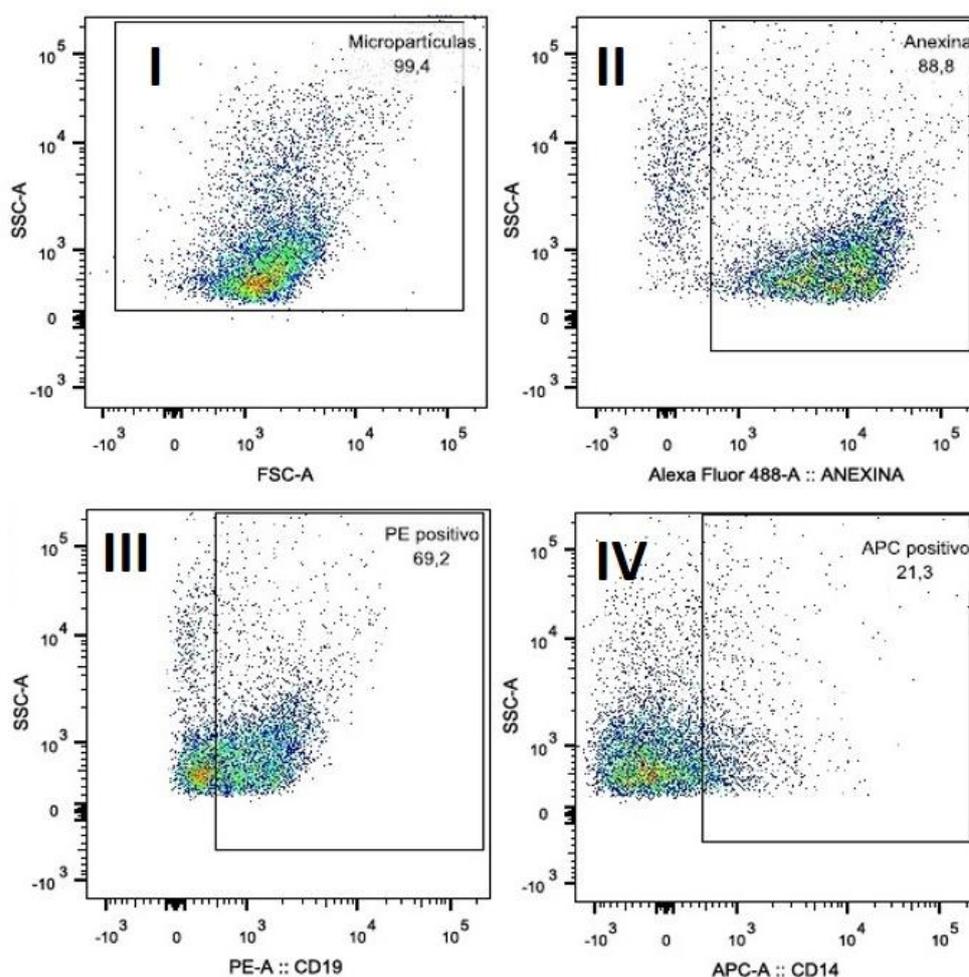


Figura 9-Estratégia de análise para a quantificação das vesículas extracelulares (VEs), amostras de separação de VEs. I- o quadrante (gate) para seleção das populações das MPs; II Determinação das VEs positivas para a marcação com anexina-FITC; III :Determinação das micropartículas de origem linfocitária positivas para a marcação CD19; IV: Determinação das micropartículas de origem monocitária positivas para a marcação CD14.

As VEs padronizadas pelo método da citometria de fluxo correspondem a descrição de tamanho das micropartículas e foram então calculadas com adaptação da fórmula descrita previamente por Campos et al., 2010:

$$\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 800) / (60 \times 200)$$

Onde:

N = número de eventos adquiridos na região das MPs;

800 = volume final por tubo antes da fenotipagem (μl);

60 = volume de amostra analisada durante a fenotipagem (μl);

200 = volume original da suspensão de MPs (μl).

5.5.3 Extração de RNA

A extração de RNA foi baseada no protocolo do Trizol® LS. Ela foi iniciada pela diluição do sangue total a fim de facilitar o isolamento do RNA a partir do pequeno volume de sangue utilizado. Assim, em um eppendorf® foram pipetados 250 μl da amostra e 250 μl de água livre de RNAses. Em seguida, adicionou-se 750 μl de Trizol® LS, homogeneizou-se o conteúdo com a pipeta e a amostra foi incubada por cinco minutos. Após esse intervalo, acrescentou-se 200 μl de clorofórmio ao eppendorf® e foi feita homogeneização vertendo-se o tubo cuidadosamente por cerca de dez vezes. Aguardou-se quinze minutos para a incubação da amostra. O passo seguinte consistiu na centrifugação da amostra por 15 minutos à 4°C na velocidade de 12000g. Após esse processo, observou-se a formação de duas fases no interior do eppendorf®: um precipitado avermelhado e um sobrenadante incolor contendo o RNA. A fração contendo o RNA de interesse foi transferida para um novo eppendorf® para a continuidade do experimento. Ao novo tubo acrescentou-se 500 μl de isopropanol 100% gelado, aguardando-se a incubação por dez minutos. Com o término desse intervalo a amostra foi centrifugada à 4°C e velocidade de 12000g por 10 minutos. Ao fim da centrifugação, o RNA depositou-se formando um pellet no fundo do eppendorf®. O sobrenadante foi então desprezado vertendo-se o tubo

sobre um descarte. O pellet de RNA restante foi ressuspenso usando-se 1mL de etanol 75% gelado, o conteúdo dos tubos foram misturados em um vórtex por cerca de 15 segundos e foi feita uma centrifugação com as configurações de 7500g à 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o eppendorf foi colocado para secagem sobre uma folha de papel umedecida com álcool 70%. Após aproximadamente dez minutos de secagem, o conteúdo do eppendorf® consistia em um pellet de RNA. Esse material foi então ressuspenso em 40µl de água de livre de RNase e o tubo foi levado para aquecimento no banho-seco por 15 minutos em temperatura de 55°C à 60°C. Com o término das etapas do experimento as amostras foram armazenadas à -80°C até conversão em cDNA para garantir maior estabilidade para futuras aplicações.

5.5.3.1 Quantificação De RNA

Uma alíquota de 2,0 µl de cada amostra de RNA total foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop Lite –Thermo Scientific) usando-se comprimento de onda de 260 nm e 280nm com forme instruções do manual do Trizol® LS. A pureza das amostras foi verificada a partir da relação 260/280 nm, considerando a relação (260/280) das densidades ópticas (OD) igual ou maior que 1,8, como referência de boa qualidade para uso. A quantificação de RNA é recomendável para avaliar a qualidade do rendimento da extração do RNA, verificar se este está adequado para as análises e prepará-lo em concentração apropriada para síntese do DNA complementar.

5.5.3.2 Síntese Do DNA Complementar (cDNA)

O cDNA foi obtido utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems- Califórnia, EUA). A reação foi realizada conforme manual do fabricante e no termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem- Life Technologies). Em cada tubo de RT foram adicionados 2000ng da amostra de RNA. O volume final de reação foi de 20 µl por tubo. Os tubos foram devidamente

fechados e centrifugados. Para a síntese do cDNA a reação foi incubada a 25°C por 10 min; 37°C por 120 min; seguido de aquecimento a 85°C por 5 min para desnaturação da enzima empregada e os tubos foram armazenados a - 80 ° C até o momento de uso.

5.5.4 Avaliação da expressão de mRNA

A PCR em tempo real (qPCR) foi empregada para quantificação relativa dos genes das cadeias γ , δ , ϵ , e ζ do TCR/CD3 (**Quadro 3**), utilizando-se o kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (Agilent Technologies-Califórnia,EUA) e o programa utilizado no processo de amplificação das amostras foi padronizado para 50 ciclos de amplificação. No tampão de reação utilizou-se 5,0 μ l de reagente SYBR Green QPCR master mix (2x), 0,4 μ l de oligonucleotídeos (20X) (para CD3 γ CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ e GAPDH como gene endógeno), 2,5 μ l de água livre de nucleasse, 0,15 μ l do fluoróforo referência diluída e 2,0 μ l de cDNA obtido anteriormente. A reação foi realizada utilizando o aparelho QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher-Applied Biosystems-- Califórnia, EUA). A quantificação de cada amostra foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de $\Delta\Delta CT$, considerando a razão entre o gene do mRNA testado e o gene endógeno de mRNA, GAPDH, em relação à amostra de referência.

Quadro 3-Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na PCR em tempo real.

<u>Iniciadores</u>	<u>Sequência</u>
CD3 ϵ - Forward	5' -TCCCAACCCAGACTATGAGC-3'
CD3 ϵ - Reverse	5' -CAAGACTAGCCCAGGAAACAG-3'
CD3 δ - Forward	5' -TCATTGCCACTCTGCTCC-3'
CD3 δ - Reverse	5' -GTTTCAGTTGTTCCGAGCC-3'
CD3 γ -Forward	5' -GGGATGTATCAGTGTAAGG-3'
CD3 γ - Reverse	5' -CAGCAATGAAGTAGACCC-3'
CD3 ζ -Forward	5' -GCCAGAACCAGCTCTATAAAC-3'

CD3ζ-Reverse	5' -TAGGCCTCCGCCATCTTAT-3'
GAPDH -Forward	5' -GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC -3'
GAPDH -Reverse	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

Fonte: HUANG, et al (2012)

Para as amostras de extração de sangue total foram utilizados 100ng de RNA extraídos por ensaio. Já para as VEs, devido ao seu baixo rendimento, essa quantidade foi padronizada diferentemente. Por isso, para amostras de extração de RNA a partir das VEs foram utilizados 400ng a fim de se obter amplificação substancial do gene de controle endógeno.

5.5.5 Extração proteica das vesículas extracelulares

Para cada 300 uL de VEs, do sobrenadante do cultivo celular, adicionou-se 700µl de tampão de hidratação (descrito no **Quadro 4**), então foram feitos 5 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido e banho seco à 30°C respectivamente. Após estas etapas, a amostra foi congelada à -80°C até próximo passo. As amostras foram então descongeladas em banho de gelo e centrifugadas a 132 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (descrita no **Quadro 5**) e incubada no gelo por 120 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 336 x g por 10 minutos a 4°C. Então o *pellet* da etapa anterior foi lavado duas vezes com acetona previamente gelada (20°C) e esse *pellet* ficou secando à 25°C. O *pellet* foi ressolubilizado com 300µl de tampão de hidratação para posterior análises. Um gel de poliacrilamida foi então realizado para corrida bidimensional (SDS-PAGE) (composição do **Quadro 6**), a fim de observar o perfil das proteínas extraídas.

Quadro 4- Composição do tampão de hidratação

Tampão de hidratação
CHAPS 4%
URÉIA 7M
TIOURÉIA 2M

Quadro 5-Composição da solução de TCA 10%

TCA 10%
0,5g de TCA
qsp 4mL de Tampão sódio-fosfato (PBS)

Quadro 6-Composição do gel de poliacrilamida SDS-PAGE utilizado para análise de extração proteica

Gel de poliacrilamida para análise de proteínas	
Reagente	volume
GEL DE SEPARAÇÃO	
Água MilliQ	7,4 mL
Acrilamida/Bis acrilamida	3,5mL
Tris Base 1,5M pH:8,8	3,75mL
SDS	8µl
APS 10%	50µl
TEMED	10µl
Gel de empilhamento	
Água MilliQ	3,05 mL
Acrilamida/Bis acrilamida	650µl
Tris Base 0,5M pH:6,6	1,25 mL
SDS	3,2µl
APS 10%	25µl
TEMED	5µl

5.6 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelos testes de comparação múltipla, para comparação de três grupos, test t para comparação de dois grupos, utilizando o software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). O tamanho amostral foi estimado considerando as diferenças esperadas entre as medias e o desvio esperado, considerando-se um poder de teste de 0,8, com α de 0,05. O teste de Spearman foi utilizado para investigar a possível correlação entre as variáveis estudadas. Os níveis de significância foram estimados pela aplicação do teste do qui-quadrado. O software GraphPad Software, La Jolla California EUA foi usado para cálculo de outlier (site: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>. Acessado em 14/04/2018). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6- RESULTADOS

6.1- Baseline

A população de estudo compreendeu 28 pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) com idade média de 65,7 anos (faixa etária 49 – 90anos); 17 do sexo masculino e 11 do sexo feminino. O diagnóstico foi realizado através de avaliação clínica, hemograma e imunofenotipagem pelos médicos do Setor de Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a classificação de Binet: Binet A: 23 pacientes Binet B+C: 5 pacientes para posteriores correlações dos dados.

O grupo controle foi composto por 24 indivíduos saudáveis, moradores da comunidade em geral e nível sócio-econômico similar aos pacientes com LLC, doadores voluntários de sangue periférico, com idade média de 66,2 anos (faixa etária 51-80 anos); 12 do sexo masculino e 12 do sexo feminino. Os dados clínicos e laboratoriais dos integrantes do estudo estão apresentados na **Tabela 1**. Foram observadas diferenças significativas na análise do hemograma quando comparado os grupos de pacientes com LLC e Grupo Controle. Diferenças significativas foram encontradas na contagem eritrócitos, na concentração de hemoglobina, na contagem de plaquetas, na contagem de leucócitos e de linfócitos ($p < 0.05$) conforme (**Tabela 1**).

Tabela 1 -Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LLC e grupo controle.

	Pacientes	Controle	Valor de p
Eritrócitos* (10^6 /mm ³)	4,27 (+/-0,787)	5,29 (+/-0,809)	P = <0,001
Hemoglobina** (g/dL)	13,5 (12,125-14,800)	15,3 (14,300-17,100)	P = 0,003

Plaquetas** (10 ³ /mm ³)	122,0 (79,75-212,0)	227,0 (172,0-287,0)	P <0,001
Global de Leucócitos* (10 ³ /mm ³)	40,19 (+/-40,74)	6,16 (+/-1,9)	P=0,0002
Linfócitos** (10 ³ /mm ³)	19,85 (9,80-43,44)	2,40 (2,00-2,80)	P <0,001

*: média ± SD; **: Mediana e intervalo interquartilico

6.2- Validação do cultivo celular

A curva de sobrevivência demonstrou que até 48 hs a perda celular foi de aproximadamente 7% apenas (**Gráfico 1**). Baseando-se nisso, foi estimada utilização de VEs do cultivo celular a partir do sobrenadante de 48 horas de cultura, uma vez que, nesse período a população celular teve melhor aproveitamento para os experimentos em geral. Esse período de cultivo foi importante inclusive para não propiciar dúvida com os resultados de morte celular com o IC_{50} calculado. O IC_{50} calculado, para fármaco fludarabina em células *ex vivo* de PBMC leucêmicas, por programa OriginPro8 demonstrou concentração média de 11,76 ug/mL (ou 32,20uM)

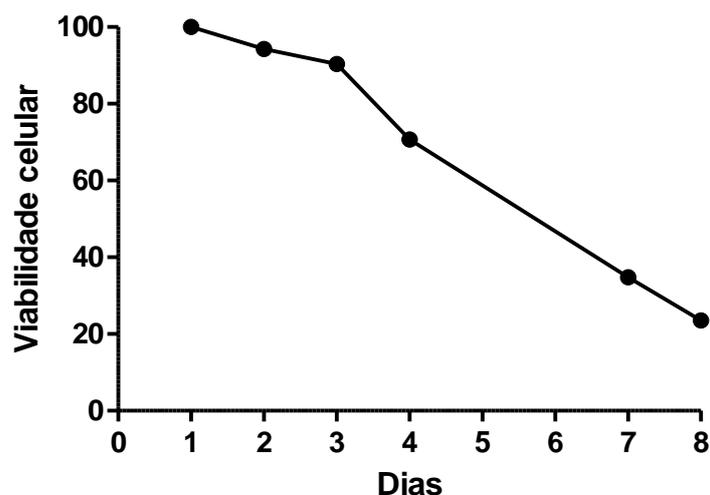


Gráfico 1-Análise da sobrevivência de células de PBMC de pacientes com LLC cultivadas (ex vivo)

6.3- Perfil de distribuição do diâmetro das VEs, por NTA, antes e após exposição à fludarabina

Na análise de distribuição geral de tamanho médio das VEs por rastreamento de nanopartículas-(NTA), todos os grupos demonstraram perfil heterogêneo com predominância de tamanho correspondente à classificação de micropartículas (100 a 1000 nm). Entre o grupo controle e VEs de cultura *ex vivo* de PBMC de pacientes com LLC as medianas foram diferentes (**Figuras 10 e 11**), porém a concentração de vesículas não apresentou diferença estatística ($p=0,110$)(**Gráfico 2**).

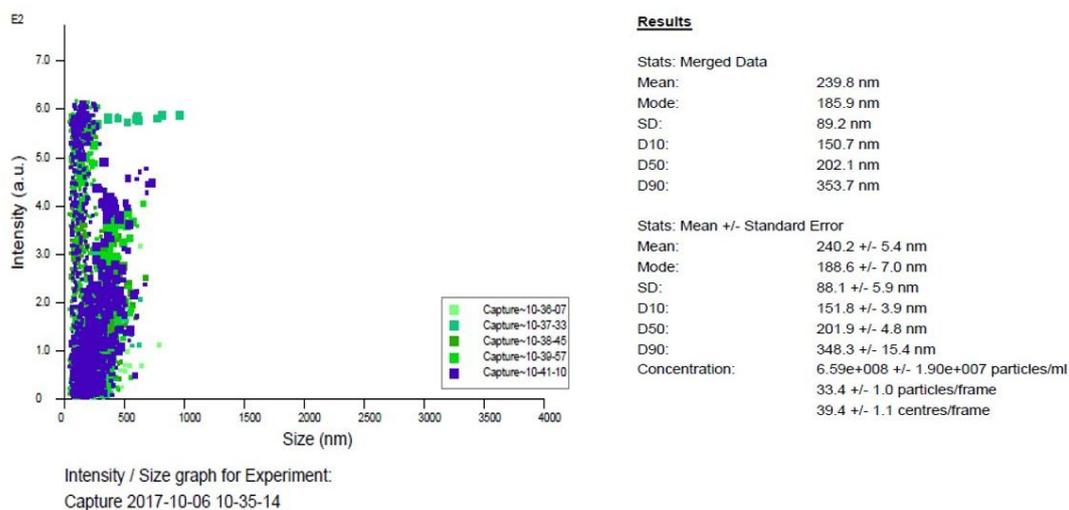


Figura 10- Determinação do diâmetro de VEs obtidas de grupo controle utilizando a análise de Rastreamento de Nanopartículas, (NTA). Imagem do software NanoSight 2.3, de amostra de controle. Distribuição heterogênea, com predomínio de vesículas compatíveis com descrição para micropartículas. Mediana = 188.6 (+/- 7,0 nm)

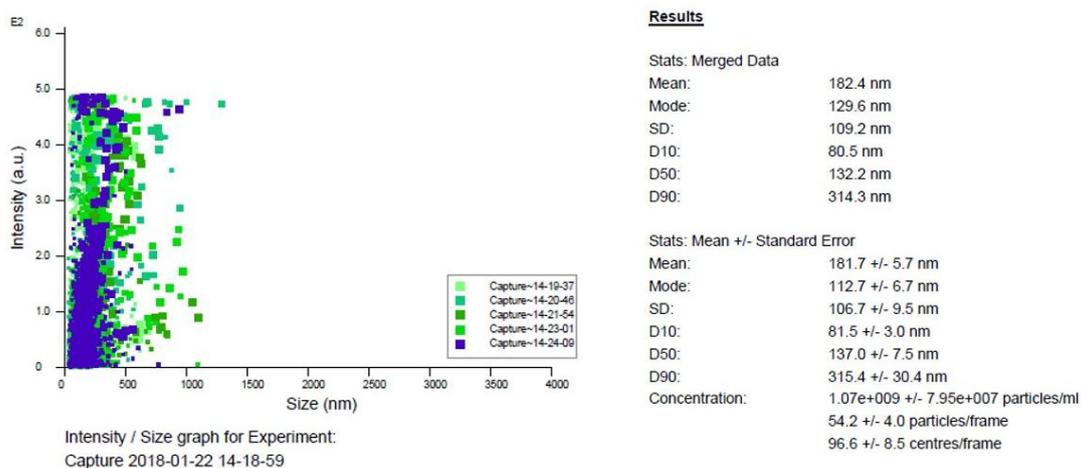


Figura 11- Resultado da análise, por NTA no software NanoSight 2.3, de amostra de cultivo ex vivo sem exposição a fludarabina. Distribuição heterogênea, com predomínio de vesículas compatíveis com descrição para micropartículas. Mediana = 112,7 (+/- 6,7nm)

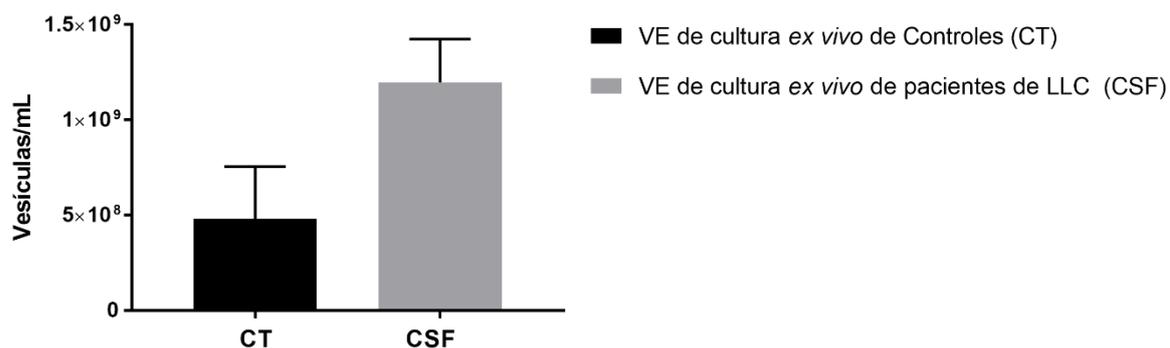


Gráfico 2- Concentração de VEs obtidas em cultura de PBMC ex vivo de controle e pacientes com LLC

Avaliando a interação com quimioterápico fludarabina, a mediana também foi diferente da cultura sem exposição a fludarabina e do controle (**Figura 12**).

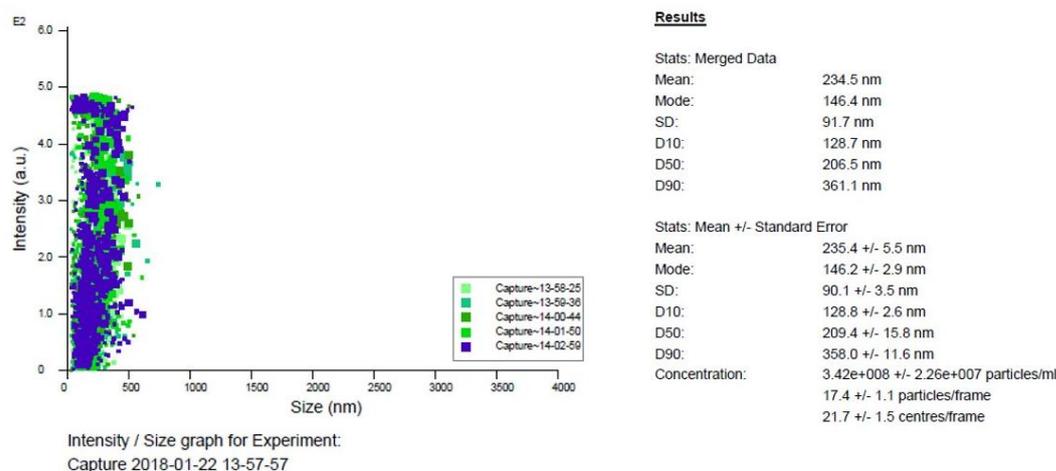


Figura 12 - Resultado da análise, por NTA no software NanoSight 2.3, de amostra de cultivo ex vivo de PBMC exposta a fludarabina. Distribuição heterogênea, com predomínio de vesículas compatíveis com descrição para micropartículas. Mediana= 146,2 (+/- 2,9nm)

Apesar das medianas diferentes para o tamanho, não houve diferença estatística comparando as concentrações médias estimadas das VEs de todos os grupos – controle, e cultura de PBMC com e sem exposição a fludarabina (**Gráfico 3**).

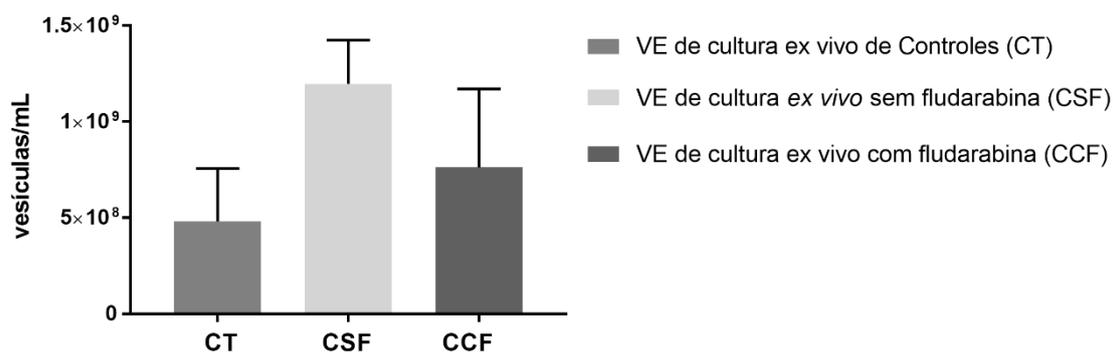


Gráfico 3- Determinação da concentração de VEs utilizando a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) . Não houve diferença significativa na concentração de VEs dos diferentes grupos . Entre controle e cultura ex vivo de PBMC sem fludarabina $p=0,110$; entre controle e cultura ex vivo de PBMC com fludarabina $p=0,8902$; entre cultura ex vivo de PBMC com e sem fludarabina $p=0,8902$.

6.4- Perfil de distribuição do diâmetro das VEs, por DLS, antes e após exposição à fludarabina

A análise da distribuição do tamanho por dispersão dinâmica de luz (DLS) confirmou o perfil heterogêneo das VEs e predomínio de micropartículas, assim como previamente relatado pela NTA (**Figuras 13, 14 e 15**).

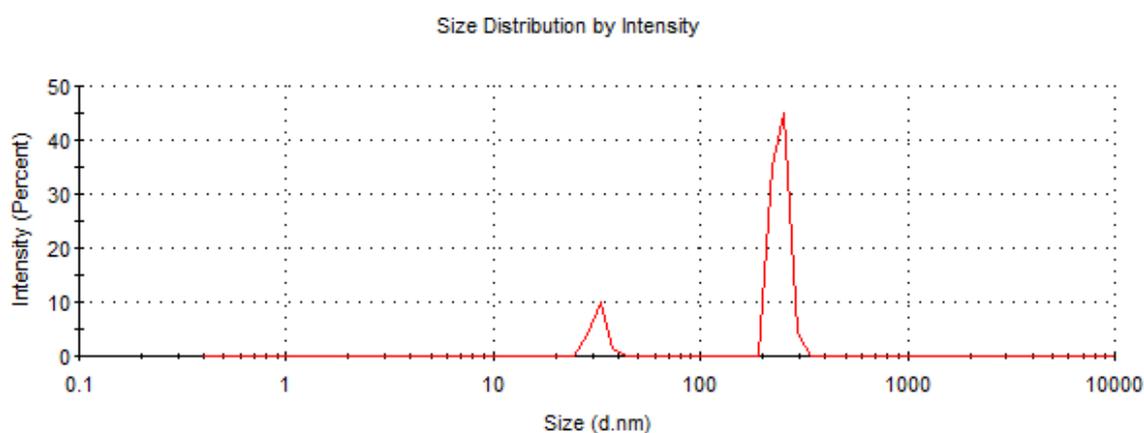


Figura 13-Gráfico de distribuição do tamanho das VE por intensidade (%) no qual se percebe distribuição heterogênea das VEs em amostra de controle com ausência de corpos apoptóticos.

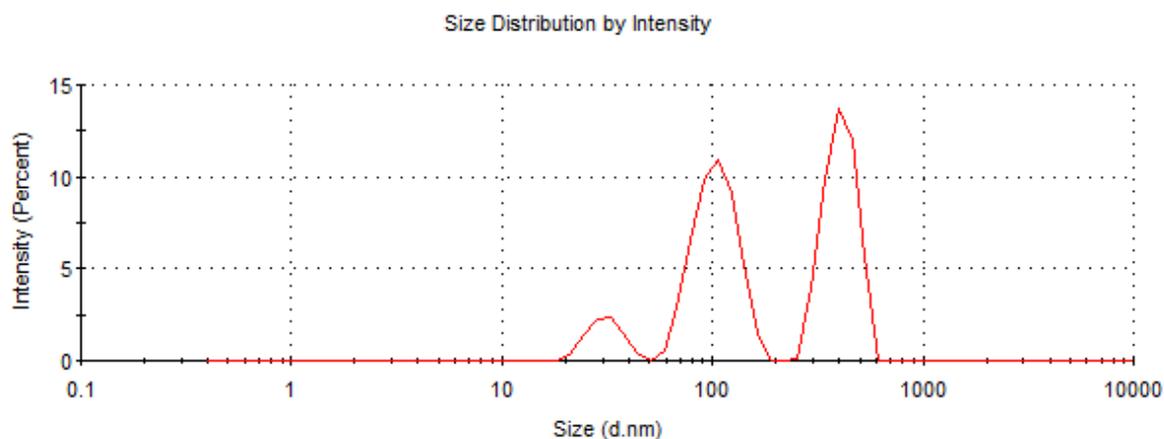


Figura 14- Gráfico de distribuição do tamanho das VEs por intensidade (%) no qual se percebe distribuição heterogênea das VEs em amostra de cultivo *ex vivo* de células de PBMC de paciente com LLC sem exposição a fludarabina. Nota-se ausência de corpos apoptóticos

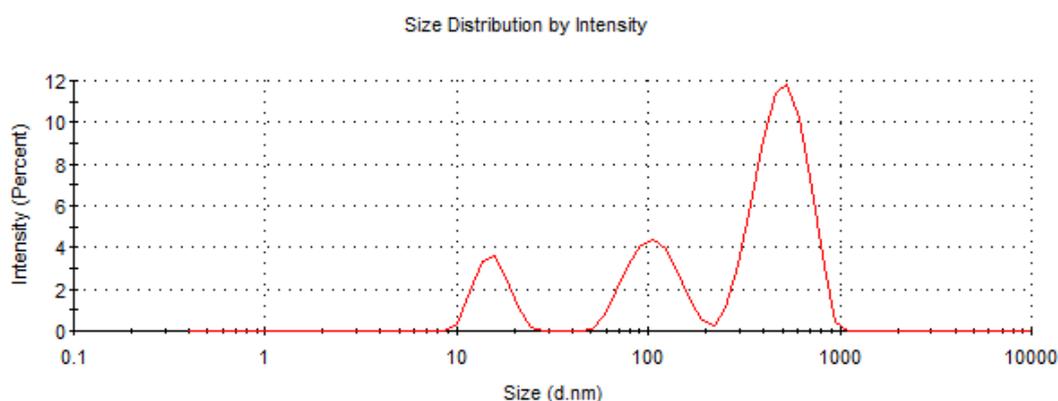


Figura 15- Gráfico de distribuição do tamanho das VEs por intensidade (%) no qual se percebe distribuição heterogênea das VEs em amostra de cultivo *ex vivo* de células de PBMC de paciente com LLC com exposição a fludarabina. Nota-se ausência de corpos apoptóticos

Alem disso, através da DLS podemos analisar os subgrupos das VEs separadamente de acordo com a intensidade (%). A exposição ou não a fludarabina não interferiu na distribuição do tamanho das vesículas extracelulares entre as culturas *ex vivo* de PBMC do grupo controle, de pacientes com LLC não expostos à fludarabina e de pacientes com LLC expostos a fludarabina (**Gráficos 4, 5 e 6**)

Foram utilizados dados da intensidade percentual em relação ao tamanho extraída do software do equipamento (ZetaSizer Software 7.11).

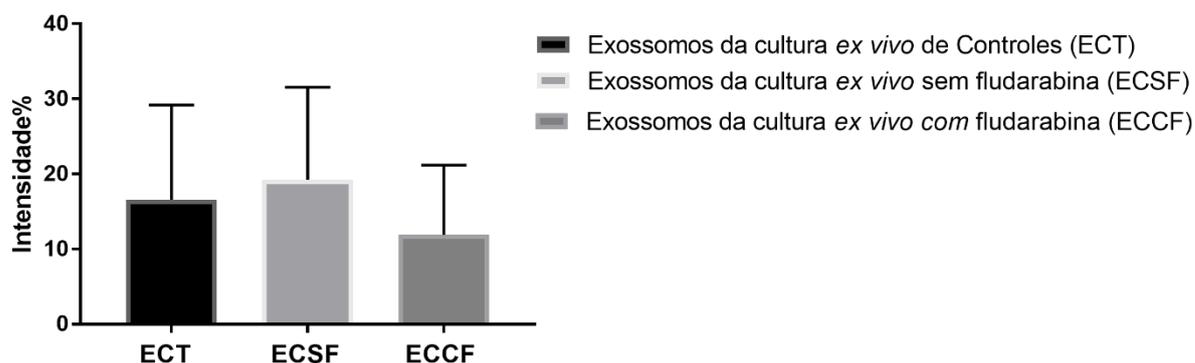


Gráfico 4- Distribuição de tamanho dos exossomos (por intensidade) .Não houve diferença significativa na distribuição dos exossomos entre os diferentes grupos ($p=0,270$).

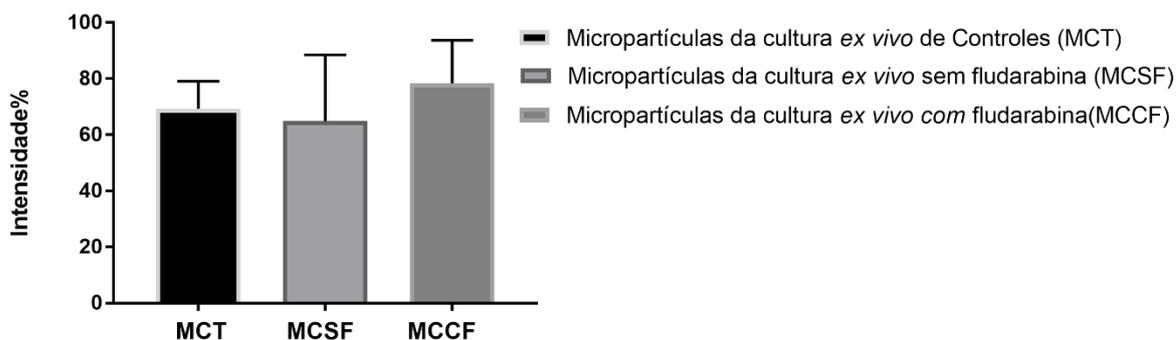


Gráfico 5- Distribuição de tamanho das micropartículas (por intensidade). Não houve diferença significativa na distribuição de micropartículas entre os diferentes grupos ($p=0,291$).

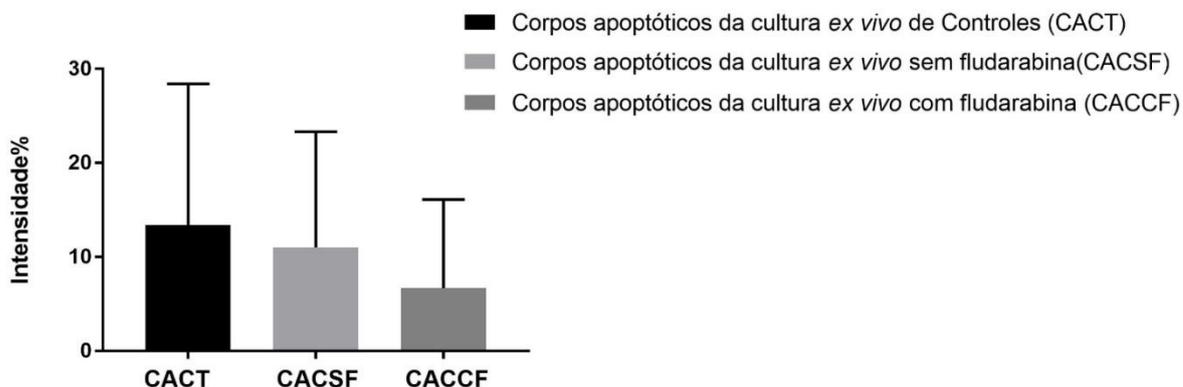


Gráfico 6- Distribuição de tamanho dos corpos apoptóticos (por intensidade) .Não houve diferença significativa na distribuição de corpos apoptóticos entre os diferentes grupos. ($p=0,472$)

6.5- Perfil de imunofenotipagem das VEs antes e após exposição à Fludarabina

Devido ao tamanho das *beads* utilizadas para calibração na citometria de fluxo (0,7 a 0,9 μm), considerou-se também por “micropartículas” (MPs) as VEs analisadas por este método. Os dados da imunofenotipagem das MPs mostraram predominância de MPs de origem de população linfocitária (referente a marcação por CD19)(**Gráfico 7**) em detrimento das MPs de origem de população monocítica (referente a marcação por CD14) (**Gráfico 8**).

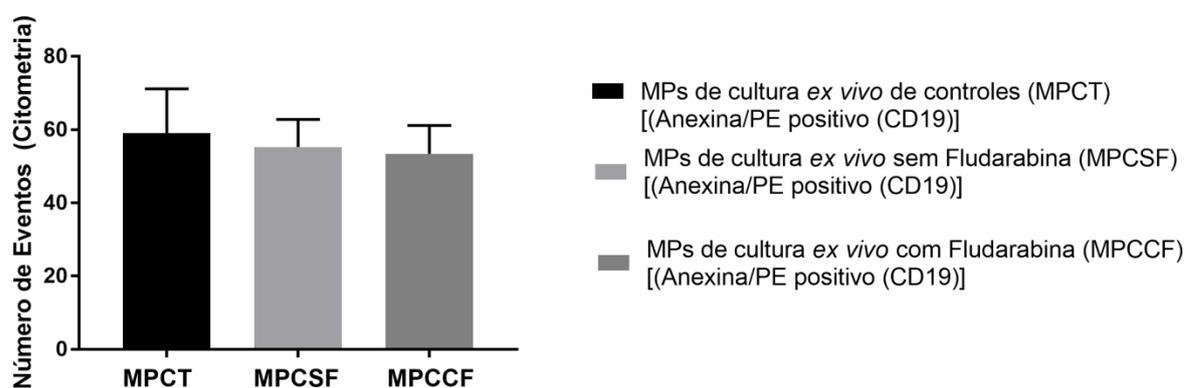


Gráfico 7- Perfil de imunofenotipagem das VEs extracelulares marcadas com CD19. As VEs também foram chamadas de MPs por este método. CD19 discrimina as MPs de origem linfocitária

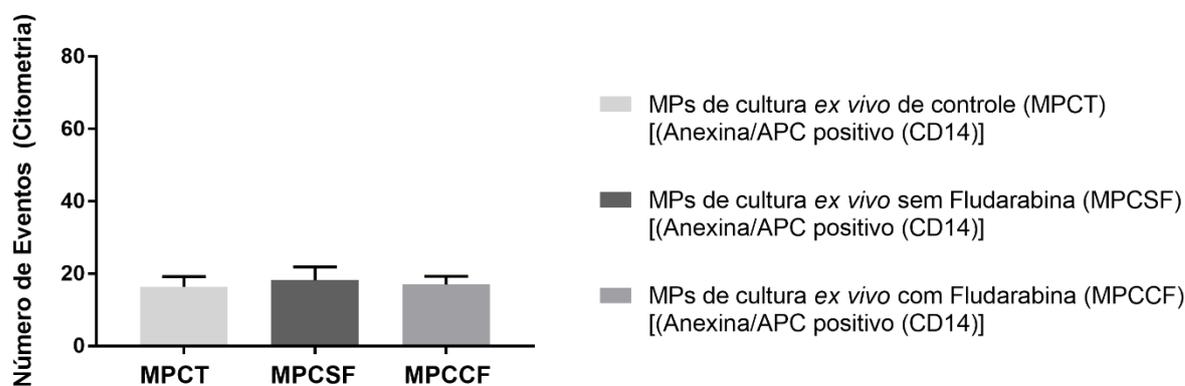


Gráfico 8- Perfil de imunofenotipagem das VEs extracelulares marcadas com CD14. As VEs também foram chamadas de MPs por este método. CD14 discrimina as MPs de origem monocítica.

A partir do número de eventos analisados pela citometria de fluxo, uma fórmula adaptada de Campos et al. (2010), permite calcular a quantidade de micropartículas por μl . A fórmula utilizada foi descrita no item 5.5.2.3. Houve diferença significativa entre MPs de cultura *ex vivo* de PBMC do Grupo Controle e das MPs de cultura *ex vivo* sem fludarabina ($p = 0,0121$) (**Gráfico 9**).

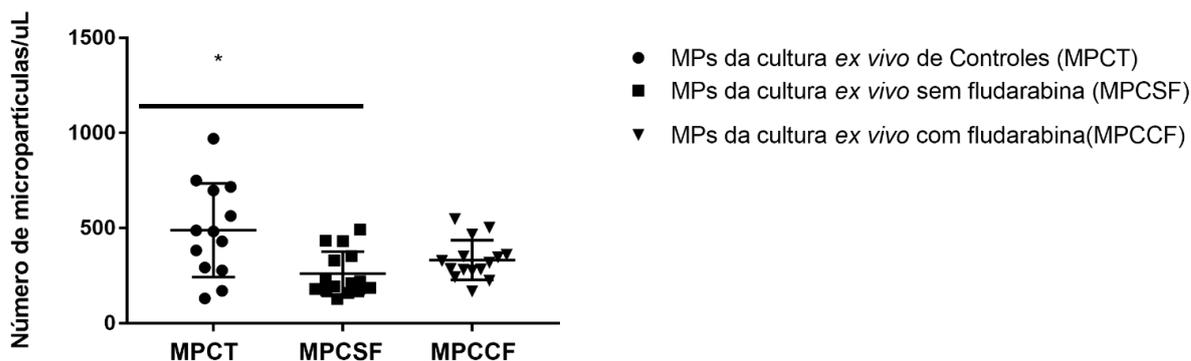


Gráfico 9- Quantidade de micropartículas.. Barras horizontais representam a média do número de MPs. *P=0,0121: Houve diferença estatística entre controle e MPs da cultura *ex vivo* de *PBMC* sem fludarabina. Não foram encontradas outras correlações entre os dados.

Diante do perfil de distribuição analisado acima, a próxima etapa foi verificar o perfil da expressão dos genes do complexo CD3 do TCR ente pacientes com LLC e controle, seguido da verificação se as VEs estariam carreando mRNAs deste complexo associado a imunodeficiência conforme dados abaixo

6.6- Análise da expressão do mRNA dos genes do complexo TCR/CD3

Foi feita análise de expressão dos genes das cadeias ϵ (épsilon), δ (delta), γ (gama) e ζ (zeta) do complexo CD3 do TCR nas VEs. Os *outliers* foram identificados e a análise estatística foi realizada tanto na presença quanto na ausência desses dados e em ambas as situações as diferenças significativas foram concordantes. Na **Figura 16**, nota-se perfil de amplificação dos *primers* (sequências iniciadoras) e presença de detecção do RNAm endógeno (GAPDH)

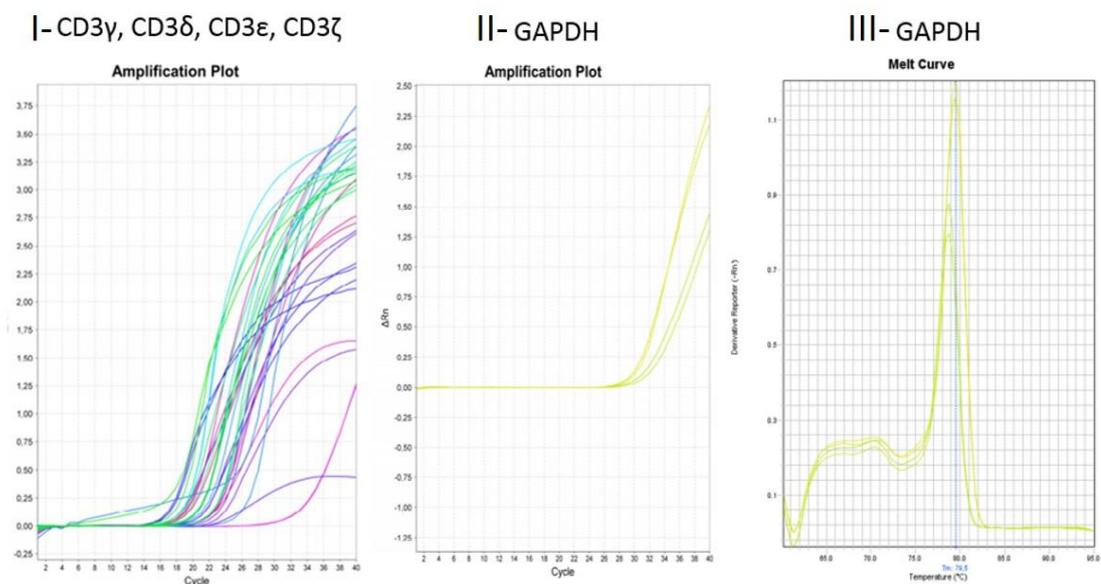


Figura 16- Perfil de amplificação da qPCR. I:Componentes da cadeia TCR/CD3 em amostra de sangue total de pacientes com LLC; II: Expressão de GAPDH em amostras extraídas de VEs de sobrenadante da cultura celular *ex vivo* do PBMC de pacientes com LLC;III: *Melt curve para GAPDH das amostras de VEs*

A análise da expressão dos genes das cadeias ϵ e ζ mostrou diferença significativa entre amostras de sangue total dos indivíduos do grupo controle e amostras de sangue total de pacientes com LLC sendo menos expressa nos pacientes ($p=0,008$). Já para as cadeias γ e δ não houve diferença significativa de expressão. Foi detectado o carreamento do mRNA dos genes do complexo CD3 nas vesículas extracelulares liberadas em cultura *ex vivo* de PBMC dos pacientes com LLC, embora não estatisticamente relevantes (**Gráficos 10,11,12 e 13**).

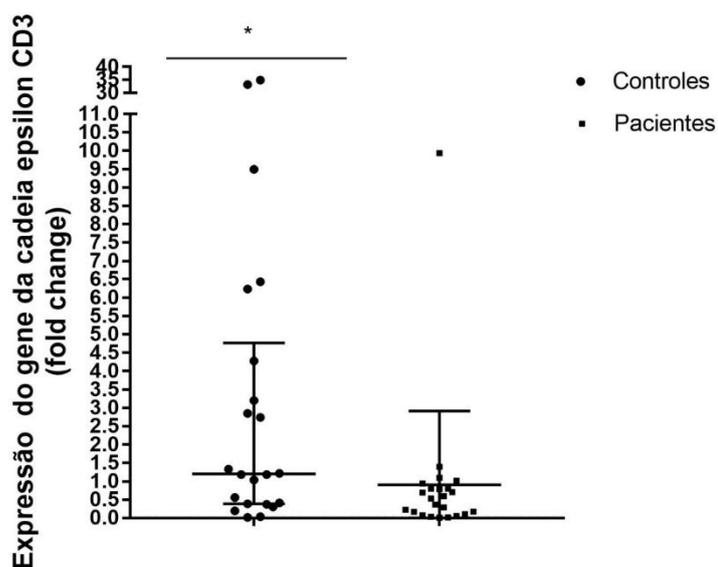


Gráfico 10- Expressão da cadeia ϵ (épsilon) do complexo CD3. *Houve diferença significativa entre controle e pacientes com LLC ($p=0,008$). Barras horizontais representam mediana e intervalo interquartil da expressão.

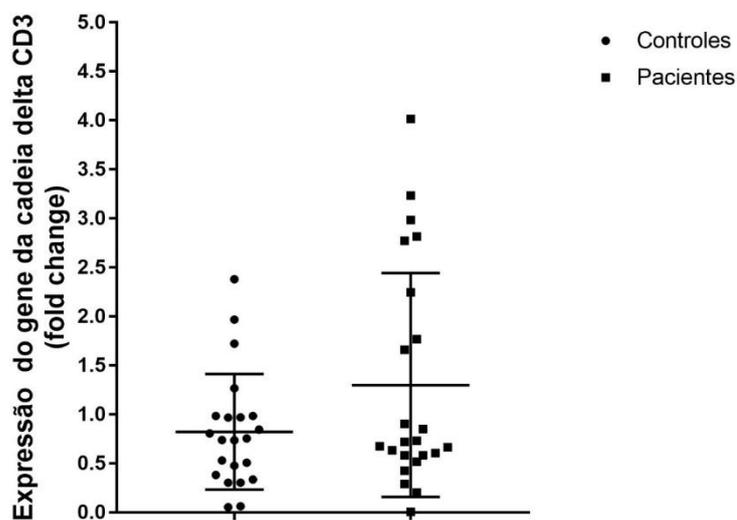


Gráfico 11-Expressão do gene da cadeia δ (delta) do complexo CD3. Não houve diferença significativa entre controle e pacientes com LLC ($p=0,433$). Barras horizontais representam mediana e intervalo interquartil da expressão.

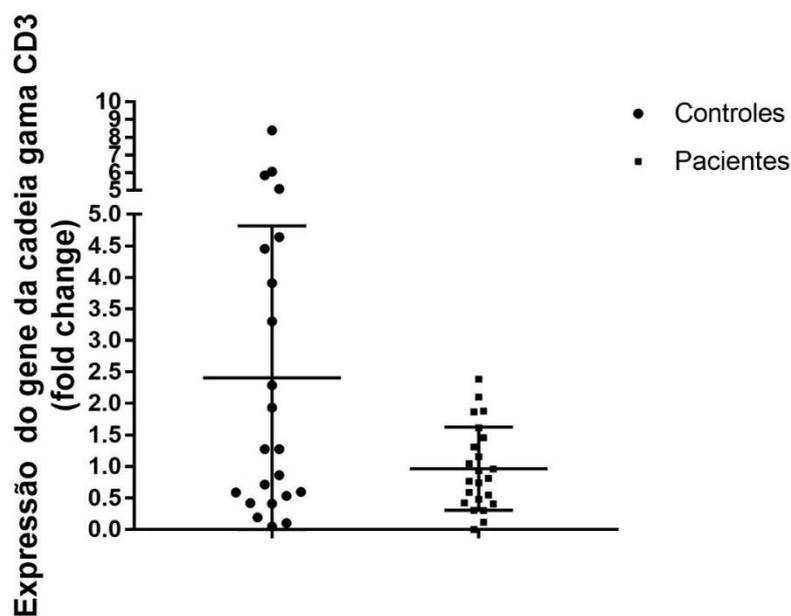


Gráfico 12-Expressão do gene da cadeia γ (gama) do complexo CD3. Não diferença significativa entre controle e pacientes com LLC ($p=0,143$). Barras horizontais representam mediana e intervalo interquartil da expressão.

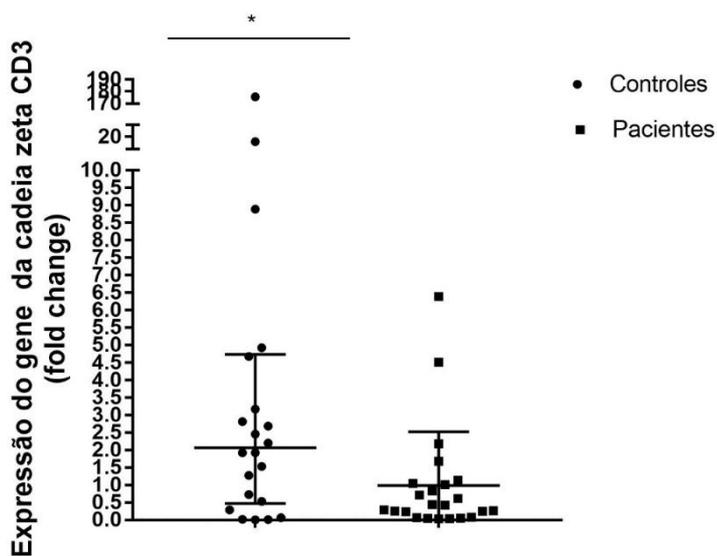


Gráfico 13-Expressão do gene da cadeia ζ (zeta) do complexo CD3. * Houve diferença significativa entre controle e pacientes com LLC ($p=0,014$). Barras horizontais representam mediana e intervalo interquartil da expressão.

6.7- Perfil proteico das VEs

Podemos avaliar na **Figura 17**, a qualidade e perfil da extração proteica em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e coradas com comassie

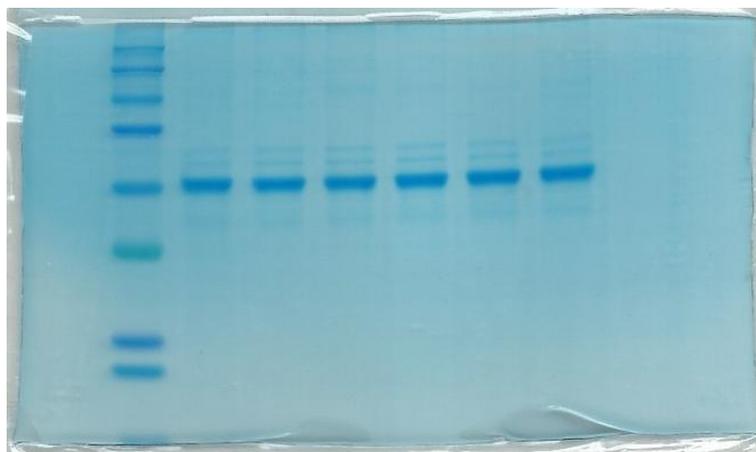


Figura 17-Gel de poliacrilamida SDS-PAGE da extração proteica inicial de VEs do sobrenadante da cultura celular *ex vivo* de PBMC de pacientes com LLC. Gel desidratado. Primeira canaleta represent padrão de peso molecular e nas canaletas seguintes replicatas de mesma pool de amostras extraídas. Peso molecular próximo a 75 KDa.

A análise qualitativa do conteúdo proteico das VEs pode ser visualizada na **Figura 18**. Devido ao menor número de pacientes com LLC de classificação Binet B e Binet C, esses dois foram estudados em conjunto (Binet B+C). Foram utilizadas também nesta avaliação, duas amostras de pacientes com LLC sem nenhum tipo de tratamento quimioterápico porque foram importantes na padronização do cultivo *ex vivo* (canaletas identificadas como 2 e 3 do gel na **Figura 18**). Avaliamos no gel, portanto, extração proteica de: VEs de controle; VEs de pacientes Binet A sem exposição *in vitro* à fludarabina; VEs de pacientes Binet A expostas *in vitro* à fludarabina; VEs de pacientes Binet B+C sem exposição *in vitro* à fludarabina, VEs de pacientes B+C expostos à fludarabina. Através da interpretação da captura da imagem do gel de poliacrilamida pelo programa Image J (Fiji 1.46), foi possível perceber aumento de cerca de 4,16% no conteúdo proteico das VEs provenientes do cultivo *ex vivo* de PBMC de pacientes de Binet B+C em relação aos pacientes Binet A (seta vermelha) referente a proteínas de peso molecular mais próximas de 50KDa que de 75KDa conforme **Figura 18**.

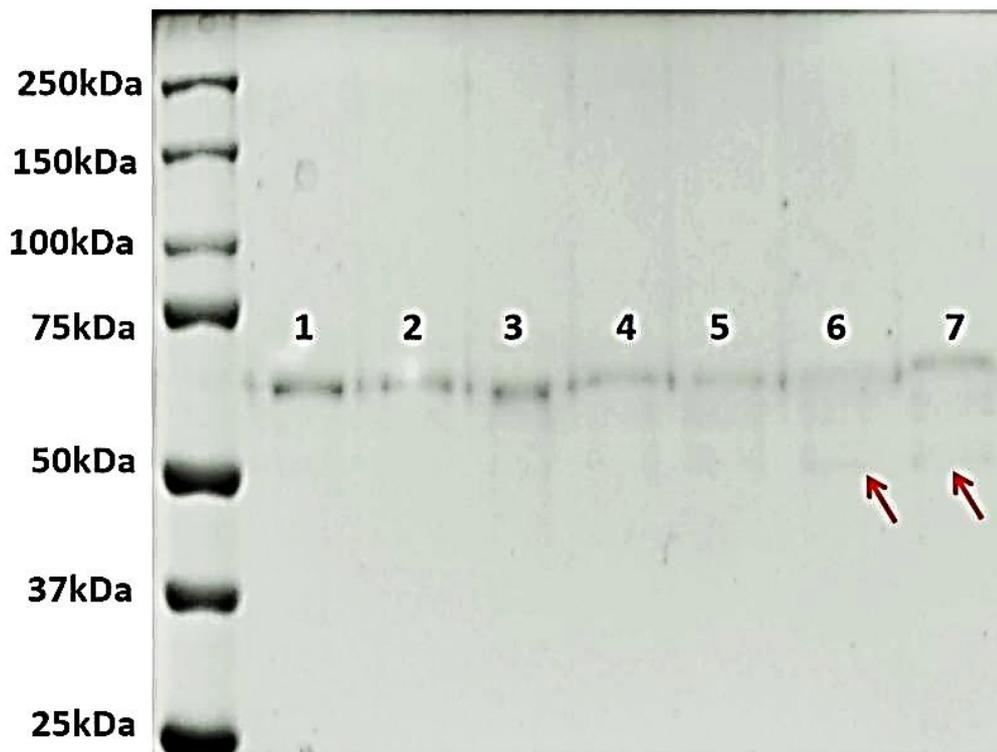


Figura 18- Gel de poliacrilamida SDS-PAGE da extração proteica das VEs corado com prata. 1- Pool de amostras de controle; 2- Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes sem tratamento para LLC sem exposição a fludarabina ; 3-Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes sem tratamento para LLC com exposição a fludarabina; 4-Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes Binet A sem exposição a fludarabina; 5- Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes Binet A com exposição a fludarabina; 6- Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes Binet B/C sem exposição fludarabina; 7-Pool de amostras de cultivo ex vivo de PBMC de pacientes Binet B/C com exposição a fludarabina.(Seta vermelha indica posição de novas bandas em relação às outras amostras)

7-DISCUSSÃO

A ocorrência de casos de LLC é muito comum após a idade de 60 anos, neste estudo, a idade dos pacientes começa em 49 anos. Dois pacientes tinham idade entre 50 e 60 anos e os outros 26 pacientes tinham idade superior a 60 anos com predomínio de pacientes com 70 e 80 anos (11 e 8 pacientes respectivamente). Pacientes idosos tendem a desenvolver doença mais agressiva, principalmente devido a comorbidades já existentes antes do diagnóstico.

Sabidamente, a LLC, do ponto de vista de tratamentos, é uma doença incurável, e vários são os biomarcadores de prognósticos para ajudar na classificação clínica e no melhor esquema quimioterápico para os pacientes com LLC, nesse contexto, a busca de biomarcadores para prognóstico e, até mesmo, diagnóstico, se torna coerente e necessária. Quanto as características clínicas da doença, conforme observado neste estudo, envolve os achados de linfocitose e anemia nestes pacientes. Sabe-se que uma das alterações relacionadas com a instalação de anemia nestes pacientes deve-se ao envolvimento extenso da medula óssea que leva à anemia progressiva em pacientes com LLC, sendo que em 10 a 15% dos pacientes, a anemia é do tipo hemolítica autoimune podendo ter influência da própria fludarabina. Os linfócitos B na LLC geralmente produzem autoanticorpos. Esses autoanticorpos fazem parte da caracterização do fenômeno autoimune frequentemente observado nesses pacientes, causando anemia e trombocitopenia autoimune. Aproximadamente 2% dos pacientes com LLC apresentam púrpura trombocitopênica imune, que responde positivamente ao tratamento com corticosteroides (BORDIN, 2005; GOMES *et al.*, 2018).

Essas variações em relação ao tratamento são sempre fatores que podem alterar os dados clínicos dos pacientes com LLC, uma vez que se almeja a melhoria. No grupo de pacientes deste estudo por exemplo, 37% estavam fazendo uso de quimioterápicos (Ibrutinibe, clorambucil ou ciclofosfamida+fludarabina). A Fludarabina foi escolhida para este estudo porque é frequentemente utilizada como tratamento de primeira linha na LLC no esquema FCR: Fludarabina, ciclofosfamida e

rituximab. A Fludarabina é carregada negativamente em pH fisiológico e, portanto, é incapaz de entrar nas células(**Figura 19**)

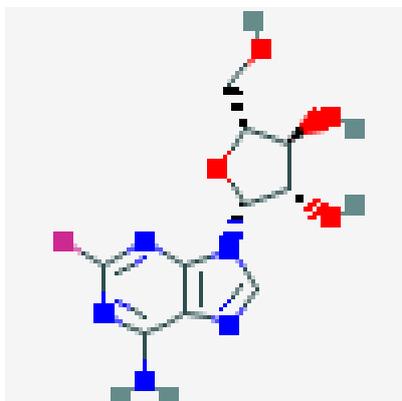


Figura 19- Estrutura da Fludarabina. Fludarabine; 21679-14-1; F-Ara-A. Fonte: Source: PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado última vez em 10 de junho de 2018

Assim, funciona como um pró-fármaco que é convertido metabolicamente, pela desfosforilação no antimetabólito F-ara-A. F-ara-A parece ser levado para dentro das células por transporte facilitado, onde é refosforilada ao monofosfato pela desoxicidina quinase e, posteriormente, do difosfato e trifosfato. O trifosfato, F-ara-ATP, é o principal metabolito intracelular da fludarabina e o único metabolito conhecido por ter atividade citotóxica. Por ser análogo de purina, certamente sua atividade citostática já é bastante descrita, principalmente a nível medular causando inclusive citopenias, mas também possui sua ação em células da circulação sanguínea. A nível celular a fludarabina também possui suas ações como inibir a DNA primase, uma proteína acessória que sintetiza um *RNA primer* necessário para iniciar a síntese da fita atrasada pela DNA polimerase. KOHNKE *et al.* (2012) também demonstraram interferência a nível molecular no uso da fludarabina, uma vez que, várias proteínas da membrana plasmática em células humanas de leucemia e linfoma foram afetadas pelo tratamento com fludarabina, incluindo diminuições no CD22 (uma molécula de adesão e sinalização) e aumentos no CD205 (um "marcador de célula danificada" majoritariamente envolvida na apoptose), CD80 e CD50 (moléculas de interação celular) (RICCI *et al.*, 2009; STRATI *et al.*, 2015 GOMES *et al.*, 2018).

No entanto, uma pergunta em relação a esse contexto da medicação foi se as VEs enquanto possíveis biomarcadores poderiam se correlacionar a alguma variação

resultante da influência de tratamento, pois, as VEs são liberadas de diferentes tipos de células em ambas condições normais e de estresse. Visto que, parecem sempre carregar a “identidade” da célula de origem, os perfis das células leucêmicas e o impacto do tratamento poderiam ser avaliados nas VEs. Sendo assim, sua atividade biológica depende da origem das células, do conteúdo que elas carregam e das condições do microambiente de sua liberação, que podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais. O microambiente pode regular sua liberação e a quantidade e qualidade do seu conteúdo (GUO *et al.*, 2018). Existe, portanto, o objetivo da biologia celular básica e estrutural de entender como, a partir de que estrutura e por quê as VEs são formadas (KOWAL *et al.*, 2016), e também, existe a importância de utilizar as VEs como biomarcadores para distinguir entre diferentes patologias (MIGUET *et al.*, 2009). Muito tem sido feito para provar que as VEs de situações patológicas diferentes possuem perfis fenotípicos diferentes, assim como KESIMER e GUPTA (2016) conseguiram demonstrar que células epiteliais de mesmo sítio, liberam vesículas com propriedades físicas e tamanhos distintos. Enquanto isso, HONG *et al.*, (2014) demonstraram que o tratamento quimioterápico em pacientes com leucemia mieloide aguda, modificou o perfil das VEs. Essas características investigadas nas VEs poderiam se aplicar ao contexto dos pacientes com LLC, uma vez que, atualmente, há uma necessidade muito grande de estabelecer e prever progressão de uma maneira eficiente das classificações clínicas dos pacientes com LLC para melhor manejo clínico terapêutico para esses pacientes. Afinal, hodiernamente, a taxa de progressão é bastante empírica e depende do acompanhamento individual dos pacientes (CHIATTONE, 2005). Portanto, conseguir avaliar diferenças em número, tamanho e conteúdo das VEs em pacientes com LLC teriam uma infinidade de aplicações: avaliação clínica, previsão de progressão clínica, avaliação do tratamento e avaliação de doença residual mínima.

Em relação a essas VEs na LLC, nosso estudo demonstrou que há uma diferença na média da concentração de VEs entre pacientes com LLC e grupo controle, no entanto, elas não foram significativas. Outra característica avaliada nesse trabalho foi a distribuição muito heterogênea das VEs provenientes de PBMC de pacientes com LLC e que dentre os subtipos, há predomínio de micropartículas em relação a exossomos e corpos apoptóticos, e, uma correlação positiva entre número de MPs e linfocitose - característica da LLC. Dados prévios do grupo demonstraram que as

MPs de origem linfocitária também estão aumentadas no plasma dos pacientes com LLC. Nesse sentido, uma possível padronização das VEs poderia torná-las potenciais biomarcadores na classificação clínica, ou mesmo avaliar remissão com tratamento, uma vez que o aumento das MPs se relaciona ao aumento dos linfócitos também. Certamente, que outras patologias que envolvem os linfócitos, principalmente Linfócitos B, deveriam ser avaliadas para aumentar especificidade descartando corretamente situações de resultados falso-positivos.

Também foi demonstrado, neste trabalho, que o tratamento quimioterápico é capaz de alterar, para mais, o número de MPs de tamanhos maiores, mesmo que aparentemente não modifique significativamente a concentração total de VEs. Isso sugere que VEs de origens e tamanhos diferentes podem ser liberadas diferentemente em resposta ao tratamento quimioterápico. Logo, uma subclassificação em maiores subtipos das VEs pode ser proposto, uma vez que a faixa de distribuição de tamanho não é igual, pois exossomos vão de aproximadamente 25 a 100nm, enquanto MPs vão de 100 a 1000nm, ou seja, quase 10 vezes maior a faixa de tamanho. Baseado nestas observações, uma proposta seria dividir nas 3 faixas seguintes: MPs menores de 100 a 400nm, MPs médias de 400 a 700nm, e MPs maiores de 700 a 1000nm, neste caso, essa é uma divisão teórica, o ideal seria avaliar o padrão de atividade biológica ao longo das faixas de tamanho. Nessa classificação, baseando nos resultados deste trabalho, poderíamos avaliar, por exemplo, se um perfil pró-inflamatório aumentaria mais o número das MPs menores ou das MPs maiores; se a resposta ao tratamento aumentaria mais o número das MPs médias ou mesmo exossomos.

Ao inquirir todo esse contexto da LLC, as VEs juntamente às influências da quimioterapia, uma das perguntas que sustentaram este trabalho foi: qual poderia ser a extensão do envolvimento das VEs na evasão imune observada nos pacientes com LLC. Sabe-se que a desregulação imune é uma característica fundamental da leucemia linfocítica crônica. Desde anemias autoimunes agravadas por tratamentos até ocorrência de infecções (BORDIN, 2005; FORCONI; MOSS, 2015). Cerca de 25% dos pacientes com LLC diagnosticados apresentam hipogamaglobulinemia e um adicional de aproximadamente 25% desses pacientes com níveis normais de imunoglobulina no diagnóstico desenvolverá hipogamaglobulinemia durante o curso de sua doença. Essas informações são importantes em virtude de que uma

diminuição nos níveis gerais de IgG aumentam a predisposição a infecções (MEDSKER *et al.*, 2016). Dentre as principais infecções que acometem os pacientes com LLC estão as bacterianas sendo o *Streptococcus pneumoniae* de maior importância seguida por outros causadores de pneumonia como *Pneumococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pneumocystis carinii* e *Aspergillus fumigates*. Também estão bem relatadas incidências de infecções por Epstein-Barr vírus, citomegalovírus, herpes tipo 1 e 2, hepatite B e adenovírus (ABBASI, 2012). Essa função imune debilitada é grande parte devido a defeitos em linfócitos T. As funções dos linfócitos T também dependem de receptores co-sinalizadores, inibitórios ou estimulantes (PALMA *et al.*, 2017). A disfunção dos linfócitos T em pacientes com LLC pode ser atribuída a alterações da expressão dos componentes do complexo TCR/CD3 e tirosina quinases intracelulares associadas. O receptor TCR convencional é expresso pela maioria dos linfócitos T e consiste de duas cadeias polipeptídicas glicosiladas (alfa e beta) mantidas juntas por ligações dissulfeto. O TCR alfa/beta é por sua vez associado fisicamente (mas não por ligação covalente) a uma proteína chamada CD3, formando o complexo funcional TCR-CD3 na superfície dos linfócitos T. O TCR alfa/beta deve discriminar os diferentes peptídeos não-próprios apresentados pelas moléculas de MHC na superfície das células apresentadoras de antígenos. O TCR alfa/beta participa na interação peptídeo-MHC e o CD3 na transdução de sinais no interior dos linfócitos T (Figura 20) (ABBAS *et al.*, 2008).

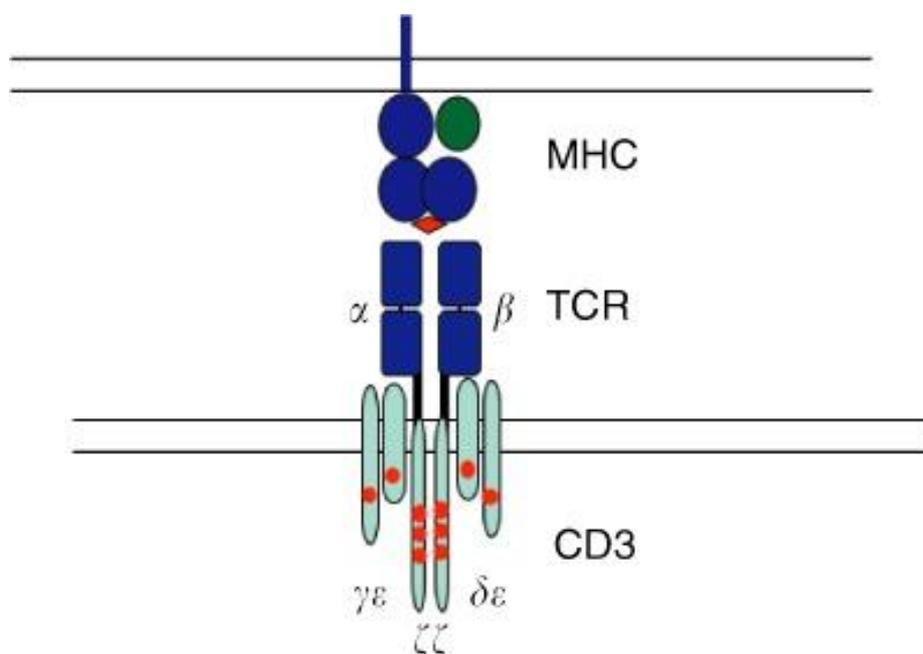


Figura 20- Receptor de células T (TCR) e sua interação com cadeias do complexo CD3. Nota-se interação das cadeias α e β e as cadeias do CD3 na transdução do sinal intracelularmente. Fonte: STAUSS *et al.*, (2007)

Estudos tem apresentado dados de expressão da cadeia ζ do complexo TCR/CD3 em pacientes com LLC e outras neoplasias. Esta abordagem ganha importância principalmente devido à associação com a proteína ZAP-70 que tem sido considerada um biomarcador de prognóstico em LLC. Esses estudos indicaram anormalidades múltiplas de células T, especialmente em LLC de fase indolente, sugerindo um estado de ativação crônica e aberrante. Há relatos de expressão de TCR alterada em 64% dos pacientes com neoplasias mieloides (incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e síndrome mielodisplásica), e a redução da expressão do gene da cadeia ζ sendo mais pronunciado nas células *Natural Killer* (NK) do que as células T levando até mesmo à deficiência de NK em alguns casos. A recuperação da expressão dos genes da cadeia do TCR foi associada à indução de remissão bem sucedida, enquanto os pacientes com doenças refratárias falharam em fazê-lo. A ausência da cadeia ζ do complexo TCR/CD3 não apenas influencia a expressão de TCR na membrana celular e o número de células T circulantes positivas (CD4+ ou CD8+), mas também prejudica a resposta proliferativa e o nível de ativação de linfócitos maduros. Desta maneira, podemos melhor compreender não só a imunodeficiência contra agentes infecciosos, mas também a evasão do sistema imune em reconhecer as células cancerosas (WHITESIDE, 2004; KIAI *et al.*, 2005; LI, 2008; CHEN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; UPRETI *et al.*, 2016). É sabido que deficiências em CD3 ϵ , CD3 γ e CD3 ζ resultam em bloqueio grave da maturação de timócitos no estágio DN (fase duplo negativa dos linfócitos (CD4⁻/CD8⁻). Sendo o bloqueio mais grave causado por remoção de CD3 ϵ que leva a um comprometimento completo do desenvolvimento dos timócitos no estágio DN. A situação é diferente para os estágios subsequentes da diferenciação do timócito, incluindo seleção tímica. Para estas fases, todos os três dímeros parecem ser importantes, pois a seleção fica severamente prejudicada na ausência de qualquer das cadeias do CD3. (DAVE, 2009). Nesse enquadramento, este trabalho demonstrou diminuição da expressão dos gene da cadeia ζ e ϵ do complexo TCR/CD3, conforme já descrito anteriormente por HUANG *et al.*, (2012). Neste estudo a população era de origem asiática e uma perspectiva de uma população

brasileira poderia agregar maiores informações, por isso foi repetida esse padrão de genes da cadeia do TCR/CD3, e de fato, curiosamente, não encontramos diferenças significativas na expressão dos genes do gene da cadeia γ como esse outro grupo relatou.

Essa relação dos linfócitos T com os linfócitos B é muito importante pois são os linfócitos T que, estimulam a expansão clonal das células B, a mudança de classe, a maturação da afinidade e a diferenciação em células B de memória. A apresentação de antígenos processados pelos linfócitos B ativados ao TCR permite a aproximação e contato dos linfócitos, importante para garantir a transmissão de sinais de ativação (ABBAS et al, 2008). Visto que a expansão clonal anormal dos linfócitos B é uma das características na LLC, não há como desconectar a ineficiência entre essas duas classes de linfócitos na LLC e a transdução da sinalização pelo TCR/CD3.

Além dessa associação da disrupção da eficiência dos linfócitos, este trabalho demonstrou que foi possível a detecção de expressão dos genes das cadeias do CD3 a partir de conteúdo das VEs. Devido à diminuição estabelecida na expressão dos linfócitos de sangue total, sugerimos que esse achado esteja relacionado a diminuição da disponibilidade de RNAm para expressão do complexo TCR/CD3, atuando as VEs como moduladoras da resposta imune a nível de célula T. Esse raciocínio pode ser sustentado por trabalhos anteriores que demonstraram que as VEs poderiam “reter” moléculas de fármacos em seu interior podendo atuar mais no sentido da evasão que na distribuição efetiva dos fármacos (DORAYAPPAN *et al.*, 2016; MIGUET *et al.*, 2009).

Além disso, uma vez que o tratamento com fludarabina é capaz de promover mudanças moleculares nas células expostas (KOHNKE *et al.*, 2012), neste estudo foi analisado qualitativamente as características proteicas das VEs dos pacientes com LLC. Afinal, em muitos tipos de câncer, as proteínas estão mediando reprogramação das células quanto ao metabolismo, à sobrevivência celular, da atividade antiapoptótica e estratégias de defesa, colocando as proteínas sempre

como biomarcadores potenciais. Foi observada diferença na distribuição proteica de pacientes Binet B+C em relação aos pacientes Binet A independente da exposição à fludarabina. Esse achado alimenta a perspectiva de associar novas proteínas e suas funções na patogênese da LLC, assim como ADMONI-ELISHA *et al.* (2016) associou a expressão da proteína DDX46 com menor sobrevida de pacientes com LLC podendo portanto, servir como marcador de prognóstico ou alvo terapêutico..

8-CONCLUSÃO

8.1 Por meio das técnicas de análise de rastreamento de nanopartículas e dispersão dinâmica de luz foi possível avaliar o perfil da distribuição tamanho das EVs que foi bastante heterogêneo, todavia com predomínio de MPs. Imunofenotipicamente, as VEs foram predominantemente de linfócitos confirmando o perfil do PBMC em que há predomínio de linfócitos principalmente em pacientes com LLC em que até 90% das células circulantes podem ser linfócitos B.

8.2 Quanto a exposição à fludarabina, não houve diferenças significativas de concentração nem de tamanho entre os subgrupos de VEs – exossomos, micropartículas e corpos apoptóticos- embora para MPs maiores (700-900nm) identificadas pela citometria de fluxo, a exposição ao quimioterápico tenha aumentado o número de MPs. O que pode sugerir que VEs de origens e tamanhos diferentes podem ser liberadas diferentemente em resposta a tratamentos.

8.3 Nesse contexto da LLC de interação entre linfócitos B e T através dos genes do complexo TCR/CD3, os genes para as cadeias ϵ e ζ do complexo foram menos expressos em amostras de sangue total de pacientes com LLC em comparação com controle, enquanto os genes γ e δ não tiveram expressão significativamente diferentes entre amostras de pacientes com LLC e controle. Foi detectado expressão dos genes do complexo TCR/CD3 em VEs que podem atuar como complicadoras no estado imune dos pacientes com LLC ao diminuir a disponibilização celular desses RNAm para células T.

8.4 Nessa busca de novos biomarcadores, a extração proteica analisada qualitativamente por gel SDS-PAGE mostrou discreta diferença no perfil proteico entre classificações clínicas Binet A e Binet B+C, sendo o perfil Binet B+C com aumento de proteínas de menor peso molecular

Infere-se portanto, que no presente trabalho conseguiu-se caracterizar vesículas extracelulares e expressão das cadeias do complexo TCR/ CD3 em pacientes com leucemia linfocítica crônica e que a exposição à fludarabina não evocou nenhuma diferença significativa em nenhum dos parâmetros.

8.5 Perspectivas

Como perspectivas futuras tem-se aumentar o tamanho amostral para fazer separação dos subgrupos de VEs e suas análises morfológicas e funcionais incluindo microscopia eletrônica; fazer análise proteômica das VEs antes e após exposição ao quimioterápico; avaliar a possibilidade de silenciar e/ou estimular vesiculação para fins específicos como transporte de fármacos.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H;; PILLAI, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008.

ABBASI, Farhad. Infectious Diseases and Clinical Complications During Treatment in CLL. In: OPPEZZO (Org.) *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Iran: InTech, 2012. .

ABRISQUETA, Pau *et al.* Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood*, v. 114, n. 10, p. 2044–50, 2009.

ADMONI-ELISHA, Lee *et al.* Novel biomarker proteins in chronic lymphocytic leukemia: Impact on diagnosis, prognosis and treatment. *PLoS ONE*, v. 11, n. 4, p. 1–28, 2016.

AHARON, Anat *et al.* Chemotherapy administration to breast cancer patients affects extracellular vesicles thrombogenicity and function. *Oncotarget*, v. 8, n. 38, p. 63265–63280, 2017.

ALIOTTA, Jason M *et al.* Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Experimental Hematology*, v. 38, n. 3, p. 233–245, 2011.

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

BEGLEITER, Asher *et al.* Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia-mechanism of action. *Leukemia Lymphoma*, v. 23, p. 187–201, 1996.

BINET, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, v. 48, n. 1, p. 198–206, 1981.

BOGGS, D.R. *et al.* Factors Influencing the Duration of Survival of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE*, v. 40, p. 243–254, 1966.

BORDIN, José O. Anemia hemolítica auto-imune e outras manifestações imunes da leucemia linfocítica crônica. *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, v. 27, n. 4, p. 257–262, 2005.

BRAGA, Tatiane Vieira *et al.* Evaluation of MiR-15a and MiR-16-1 as prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 92, p. 864–869, 2017.

BROOKS, Robert C. *et al.* Circulating microvesicles in B?cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Annals of Internal Medicine*, v. 156, n. 9, p. 1755–1764, 2010.

BURGER, Jan. A. Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology*, v. 2011, n. 1, p. 96–103, 2011.

CAMPOS, Fernanda Mf *et al.* Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 327, 2010.

CHEN, Shaohua *et al.* Deficiency of CD3gamma, delta, epsilon, and zeta expression in T cells from AML patients. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, v. 16, n. 1, p. 31–6, 2011.

CHIATTONE, Carlos S. Indicações para início de tratamento na leucemia linfóide crônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 27, n. 4, p. 272–275, 2005.

DA SILVA DUARTE, Alberto José. *Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa: Série da Pesquisa à Prática Clínica*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

DAVE, Vibhuti P. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunological Reviews*, v. 232, n. 1, p. 22–33, 2009.

DE FARIA, José Roberto. *et al.* Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, v. 118, n. 4, p. 83–88, 2000.

DELGADO, Julio *et al.* Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *British Journal of Haematology*, v. 145, n. 6, p. 801–805, 2009.

DIGHIERO, G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, v. 17,

n. 12, p. 2385–2391, 2003.

DIGHIERO, Guillaume; HALLEK, Michael J;; GRIBBEN, John G. CLL biology and prognosis. *American Society of Hematology/Hematology*, p. 278–284, 2005.

DÖHNER, H *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, v. 343, n. 26, p. 1910–6, 2000.

DÖHNER, Hartmut *et al.* p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*, v. 85, n. 6, p. 1580–1589, 1995.

DORAYAPPAN;, Kalpana Deepa Priya *et al.* The biological significance and clinical applications of exosomes in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 16, n. Suppl 1, p. 77–90, 2016.

FAILACE, Renato. *Hemograma - Manual de Interpretação*. 5^a ed. Porto Alegre, 2009.

FERNANDES, Margareth. *Expressão de Zap-70 e CD38 em leucemia linfocítica crônica (LLC) e sua correlação com prognóstico*. 2016. 128 f. Universidade Federal de São Paulo, 2016.

FORCONI, Francesco; MOSS, Paul. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*, v. 126, n. 5, p. 573–581, 2015.

FRENZEL, Lukas P.; REINHARDT, H. Christian; PALLASCH, Christian P. Concepts of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis: DNA damage response and tumor microenvironment. *Oncology Research and Treatment*, v. 39, n. 1–2, p. 9–16, 2016.

GHOSH, Asish *et al.* Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*, v. 115, n. 9, p. 1755, 2009.

GIUSTI, Ilaria; D'ASCENZO, Sandra; DOLO, Vincenza. Microvesicles as potential ovarian cancer biomarkers. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

GOMES, Lorena Caixeta *et al.* Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Nosso artigo, v. 97, n. July 2017, p. 349–358, 2018.

GOULD, Stephen J.; RAPOSO, Graça. As we wait: Coping with an imperfect

nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, , v. 2, n. 1, p. 3–5, 2013.

GREVER, Michael R. *et al.* Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the US intergroup phase III trial E2997. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 7, p. 799–804, 2007.

GUO, Hui-mei *et al.* Microvesicles shed from bortezomib-treated or lenalidomide-treated human myeloma cells inhibit angiogenesis in vitro. *Oncology Reports*, v. 39, p. 2873–2880, 2018.

GYÖRGY, Bence *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011.

HADERK, Franziska *et al.* Extracellular vesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, v. 54, n. August, p. 1826–30, 2013.

HALLEK, Michael. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American Journal of Hematology*, v. 92, n. 9, p. 946–965, 2017.

HALLEK, Michael *et al.* Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at High Risk of Disease Progression in Early, Nonsmoldering Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, v. 93, n. 5, p. 1732–7, 1999.

HALLEK, Michael *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, v. 111, n. 12, p. 5446–5456, 2008.

HAMBLIN, Terry. Historical Aspects of Chronic Lymphocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 111, p. 1023–1034, 2000.

HONG, Chang-Sook *et al.* Plasma Exosomes as Markers of Therapeutic Response in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. April, p. 1–9, 2014.

HUANG, Le *et al.* Expression feature of CD3, FcεR1γ, and Zap-70 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, v. 17, n. 2, p. 71–75, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/102453312X13221316477895>>.

HURLEY, JAMES H.; BOURA, EVZEN; CARLSON, Lars-Anders; Rózycki; BARTOSZ. Membrane Budding. *Cell*, v. 143, n. 6, p. 875–887, 2010.

INCA. *Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, RJ: Edição COORDENAÇÃO DE ENSINO Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Setor de Edição e Informação Técnico-Científica, 2017.

INCA. *Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014*

Jane, BAIN, Barbara . *Leukaemia Diagnosis*. 4. ed.: Wiley-Blackwell, 2010.

Jacques, Ferlay; *et al.* *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

KAMPEN, Kim R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research*, v. 36, n. 1, p. 6–13, 2012.

KESIMER, Mehmet; GUPTA, Richa ; Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods*, n. 919, p. 87–92, 2016.

KIAII *et al.* Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Medical Oncology*, v. 22, n. 3, p. 291–302, 2005.

KOHNKE, Philippa L. *et al.* Fludarabine and cladribine induce changes in surface proteins on human B-lymphoid cell lines involved with apoptosis, cell survival, and antitumor immunity. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 9, p. 4436–4448, 2012.

KOWAL, Joanna *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 8, p. E968–E977, 2016.

LI, Yangqiu. Alterations in the expression pattern of TCR zeta chain in T cells from patients with hematological diseases. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, v. 13, n. 5, p. 267–75, 2008.

LI, Yangqiu *et al.* Change in expression pattern of TCR-CD3 complex in patients with

multiple myeloma. *Hematology*, v. 16, n. 3, p. 143–150, 2011.

LOZANSKI, Gerard *et al.* Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. v. 103, n. 9, p. 3278–3282, 2015.

M., Mandle. Researches on the nature and origin of pus, its action on the blood, and the distinctive characters between pus and mucus. *The Medical Examiner*, v. 2, p. 128 – 9, 1839.

MAGNAC, C. *et al.* Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*, v. 17, n. 1, p. 133–137, 2003.

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Visualize and measure nanoparticle size and concentration. *Nanosight Range*, 2014. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/support/events-and-training/webinars/W140611nanoparticles-tracking-analysis.aspx>>.

MARTÍNEZ-LORENZO; María José *et al.* Activated Human T Cells Release Bioactive Fas Ligand and APO2 Ligand in Microvesicles 1. *The Journal of Immunology*, v. 6, n. 163, p. 1274–81, 1999.

MARTINS, S.L.R. *AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E A SUA ASSOCIAÇÃO COM A EVOLUÇÃO DO ENXERTO EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL*. 2017. 124 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA, 2017.

MAYR, Christine; SPEICHER, Mr. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 107, n. 2, p. 742–751, 2006.

MAYR, Manuel *et al.* Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, v. 2, n. 4, p. 379–388, 2009.

MEDSKER, Brock *et al.* Hypogammaglobulinemia in Newly Diagnosed Chronic Lymphocytic Leukemia: Natural History, Clinical Correlates and Outcomes. *Cancer*, v. 17, n. 121, p. 773-7792883–2891, 2016.

MIGUET, Laurent *et al.* Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 7, p. 3346–3354, 2009.

MINOT, George R.; BUCKMAN, Thomas E.; Isaacs, Raphael. CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA. *THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION*, v. 82, n. 19, p. 1489–1494, 1924.

MOLICA, Stefano.; LEVATO, Domenico. What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia? *Lymphoproliferative Disorders*, v. 85, n. June, p. 632–637, 2000.

MOLICA, Stefano ; ALBERTI, Antonio. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, v. 60, n. 11, p. 2712–2716, 1987.

MOREL, Olivier *et al.* Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, n. 1, p. 15–26, 2011.

MURALIDHARAN-CHARI, V. *et al.* Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, v. 123, n. 10, p. 1603–1611, 2010.

PALMA, Marzia *et al.* T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*, v. 102, n. 3, p. 562–572, 2017.

POLLARD, Thomas D.; EARNSHAW, William C. *Biologia Celular*. 1. ed. Porto Alegre: Elsevier / Medicina Nacionais, 2006.

RAI, Kanti R. *et al.* Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 18, n. 4, p. 795–805, 2004.

RAMOS, Teresa L. *et al.* Do endothelial cells belong to the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leukemia Research*, v. 39, n. 8, p. 921–924, 2015.

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: Exosomes,

microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RATAJCZAK, Janina; MIEKUS, K; *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, v. 20, n. 5, p. 847–856, 2006.

RATAJCZAK, Janina.; WYSOCZYNSKI, M.; *et al.* Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, v. 20, n. 9, p. 1487–1495, 2006.

REGO, E. M. *et al.* Immunophenotype of normal and leukemic bone marrow B-precursors in a Brazilian population. A comparative analysis by quantitative fluorescence cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 2, p. 183–194, 2001.

RICCI, F; TEDESCHI, A; MORRA, E. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and clinical risk management*, n. 5, p. 187–208, 2009.

RILLA, Kirsi *et al.* Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biology*, morfogenese MVstherapeutic application, 2017.

ROBAK, Tadeusz. Therapy of chronic lymphocytic leukemia with purine analogs and monoclonal antibodies. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 32, n. 1, p. 33–44, 2005.

SARFATI, M *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 88, n. 11, p. 4259–4564, 1996.

SCHENA, Marina *et al.* The role of bcl-2 in the pathogenesis of b chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, v. 11, n. 3–4, p. 173–179, 1993.

SHAHJAHANI, Mohammad *et al.* Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cellular Oncology*, v. 38, n. 2, p. 93–109, 2015.

SHANSHAL, Mohammed; HADDAD, Rami Y. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Disease-a-Month*, v. 58, n. 4, p. 153–167, 2012.

STAUSS, Hans J. *et al.* Monoclonal t-cell receptors: New reagents for cancer therapy. *Molecular Therapy*, v. 15, n. 10, p. 1744–1750, 2007.

- STRATI, Paolo *et al.* Myelosuppression After Frontline Fludarabine Cyclophosphamide, and Rituximab in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer*, v. 119, n. 21, p. 3805–3811, 2015.
- SWERDLOW, Steven H *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, v. 127, n. 20, p. 2375–2391, 2016b.
- THÉRY, Clotilde; OSTROWSKI, Matias; SEGURA, Elodie. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 8, p. 581–593, 2009.
- THORSELIUS, Mia *et al.* Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in V H 3-21 – using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*, v. 107, n. 7, p. 2889–2894, 2006.
- TURTURICI, G. *et al.* Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *AJP: Cell Physiology*, v. 306, n. 7, p. C621–C633, 2014.
- UPRETI, D *et al.* Change in CD3-chain expression is an independent predictor of disease status in head and neck cancer patients. *International Journal of Cancer*, v. 139, n. 1, p. 122–129, 2016.
- VAN GELDER, Michel *et al.* Baseline Characteristics Predicting Very Good Outcome of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Young Patients With High Cytogenetic Risk Chronic Lymphocytic Leukemia - A Retrospective Analysis From the Chronic Malignancies Working Party of the . *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, v. 17, n. 10, p. 667–675.e2, 2017.
- VIRCHOW, Rudolf Ludwig Karl. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. *Meidinger Sohn & comp*, p. 190–212, 1856.
- VYAS N, Hassan A. Recent advances in chronic lymphocytic leukemia. *Indian Journal of Cancer*, v. 49, n. 1, p. 137–143, 2012.
- WHITESIDE, Theresa L. Down-regulation of ζ -chain expression in T cells: A biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 53, n. 10, p. 865–878, 2004.

WILLMS, Eduard *et al.* Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 738, 30 abr. 2018.

WOYACH, Jennifer A. What is the optimal management of older CLL patients? *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, v. 31, n. 1, p. 83–89, 2018.

YUILLE, M R *et al.* Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *British Journal of Haematology*, v. 109, n. 4, p. 794–799, 2000.

ZAGO, Marco Antonio. *Tratado de Hematologia*. Editora Atheneu, 2014.

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia"

SUBPROJETO: Identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico em leucemia linfocítica crônica por análises metabólicas e moleculares

Prezado (a) Senhor (a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle das Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasias. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue e para realizarmos exames laboratoriais que incluem dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Em caso de formação de hematomas, todo auxílio será prestado pelo seu médico assistente. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Em caso de punção de medula, este procedimento será realizado pelo seu médico hematologista. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador. Este termo TCLE encontra-se em consonância com a RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012. Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizada à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Nome: _____

Documento de identificação: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____


Prof. Adriano de Paula Sabino

Coordenador do projeto,

Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG

Anexo 2**Documento de aprovação do Comitê de Ética**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC)" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 3

Emenda do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

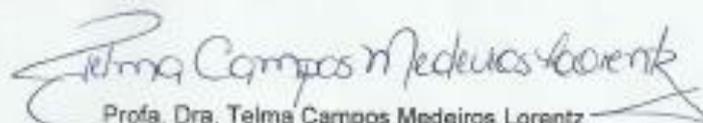
Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)" com as alterações:

- o Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- o Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia";
- o Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de efeito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- o Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

