



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA**



**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DE CÉLULAS B SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

Mestrando: FÁBIO MAGALHÃES DA GAMA

Orientador: Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA

Coorientadoras: Dra. ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE

Dra. ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO

Manaus – AM

2021

FÁBIO MAGALHÃES DA GAMA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DE CÉLULAS B SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

Dissertação para apresentação ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”.

Orientador: Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA

Coorientadoras: Dra. ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE

Dra. ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO

Manaus – AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G184c Gama, Fábio Magalhães da
Caracterização do perfil de microvesículas circulantes em
pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células
B submetidos à quimioterapia de remissão / Fábio Magalhães da
Gama . 2021
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa
Coorientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientadora: Andréa Teixeira de Carvalho
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Leucemia infantil. 2. Vesículas extracelulares. 3. Microambiente
leucêmico. 4. Citometria de fluxo. 5. Biomarcadores. I. Costa,
Allyson Guimarães da. II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

FÁBIO MAGALHÃES DA GAMA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DE CÉLULAS B SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

Dissertação para apresentação ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”.

APROVADA EM: 18 / 05 / 2021

BANCA EXAMINADORA

Dr. Allyson Guimarães da Costa, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Gemilson Soares Pontes, Membro Interno
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Leny da Mota Passos, Membro Externo
Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

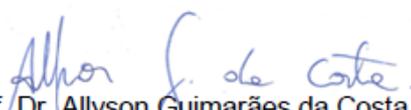


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata da Defesa de Dissertação do
aluno **FÁBIO MAGALHÃES DA
GAMA**, em 18 de maio de 2021.

Aos dezoito dias do mês de maio de 2021, às quatorze horas, na sala virtual do Google meet: <https://meet.google.com/dkc-buob-wdv>, o aluno de mestrado deste Programa **FÁBIO MAGALHÃES DA GAMA** apresentou à banca examinadora a sua dissertação de mestrado intitulada “Caracterização de microvesículas circulantes em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica aguda de células B e seu potencial uso como biomarcador imunológico”. A banca examinadora, composta pelos seguintes membros: Professor Doutor Allyson Guimarães da Costa (Presidente), Professora Doutora Leny da Mota Passos (Membro), Professor Doutor Gemilson Soares Pontes (Membro), decidiu, após a apresentação e a arguição, pela aprovação de sua dissertação.


Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa
Presidente


Prof.^a Dr.^a Leny da Mota Passos
Membro


Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes
Membro

*A **Deus**, por ter guiado meus passos, colocando pessoas incríveis e especiais em meu caminho.*

*A minha avó **Eroneide** e minha mãe **Vânia**, pelo apoio, amor e dedicação.*

*A minha bisa avó **Lucimar** (*in memoriam*), por todo o amor e exemplo de vida e humildade.*

*Aos meus irmãos **Fabrcio** e **Viviane**, pelo apoio, paciência e compreensão.*

*A minha companheira **Juliana**, por toda ajuda, tornando esse grande desafio mais leve.*

*Aos meus orientadores **Dr. Allyson**, **Dra. Adriana** e **Dra. Andréa**, pela oportunidade e confiança, e por desempenharem um papel fundamental em minha formação.*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me concedido vida, saúde e proteção ao longo dessa caminhada. Por ter me concedido uma família especial, que em meio a dificuldades me forneceu todo o suporte para que fosse possível chegar até aqui. E por guiar e conduzir minha vida, colocando pessoas especiais e insubstituíveis em meu caminho.

As minhas mães **Eroneide e Vânia**, pelo amor incondicional, dedicação e paciência. Sou grato por me ensinarem a batalhar e superar os desafios que a vida oferece, e por estarem por trás de cada uma das minhas conquistas até aqui.

A minha bisavó **Maria Lucimar (in memorian)**, pelas orações e momentos em que tive o privilégio de passar ao seu lado, aprendendo com ensinamentos valiosos e com seu lindo exemplo de vida, que me ajudaram a ser a pessoa que me tornei hoje.

Aos meus irmãos **Fabício e Viviane**, simplesmente por serem os melhores, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me suportando nos momentos de estresse.

Ao meu padrinho **Mário**, por executar essa função de maneira brilhante, sempre me ensinando, dando atenção e carinho. Sou grato por toda ajuda nos momentos de dificuldade.

Aos meus tios **Ney, Lobato, Nonato, Paulo, Filho, Lucília, Simone, Lúcia, Ana e Eduarda (in memorian)**, demais familiares e amigos, por se preocuparem com meu bem estar, pelo carinho e por desejarem o melhor para mim.

A minha amiga e companheira **Juliana Neves**, por todo amor, paciência, compreensão e claro, cafés da tarde. Sou imensamente grato por ter desbravado e compartilhado os desafios da graduação, pós-graduação e da vida, acompanhando e ajudando em toda essa longa trajetória, nos momentos bons e ruins. Essas conquistas jamais seriam alcançadas sem a sua ajuda.

Ao meu orientador e pai científico **Dr. Allyson Guimarães**, por todo carinho e atenção desde a minha época como aluno de iniciação científica. Sou eternamente grato pela brilhante orientação, pelos inúmeros ensinamentos, e pelo grande exemplo de pesquisador e pessoa. Agradeço pela amizade e por acreditar em mim desde o princípio.

A minha coorientadora **Dra. Adriana Malheiro**, pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa de excelência, nos fornecendo meios para crescermos como pesquisador e pessoa.

A minha coorientadora **Dra. Andréa Teixeira**, por tornar uma ideia em um lindo estudo. Sou grato por toda ajuda com as análises de Microvesículas e, em especial, pela oportunidade concedida de poder realizar a mobilidade acadêmica no Instituto René Rachou (IRR) - Fiocruz Minas, onde pude crescer como pesquisador e pessoa. Agradeço imensamente pela atenção, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao **Dr. Olindo Martins** pelos valiosos ensinamentos, bem como ao **Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores** do IRR-Fiocruz Minas, pela ótima recepção e colaboração. Em especial, agradeço a mestrande **Marina Silvestrini**, pela incansável ajuda, pelos ensinamentos e paciência ao longo dos ensaios de Microvesículas.

*Ao **Dr. Gemilson Pontes**, com quem pude aprender tanto, em tão pouco tempo. Sou grato pelo carinho e pelos valiosos ensinamentos, especialmente por ter dedicado seu tempo para esclarecer algumas dúvidas, que acabariam a me direcionar para o estudo das Vesículas Extracelulares, que viria a ser meu novo projeto de mestrado.*

*Ao **MSc. Nilberto Dias**, por toda ajuda prestada para ingressar no PPGIBA e pela ajuda na busca dos dados dos pacientes do estudo. Agradeço por todo carinho, ensinamento, momentos de descontração e amizade.*

*Aos colaboradores **MSc. Eliana Brasil, MSc. Socorro Sampaio e MSc. Marlon Kerr**, por todo empenho e esforço para obtenção das amostras dos pacientes e dos controles que compuseram o biorrespositório, permitindo que esse estudo fosse realizado.*

*Aos meus ex-professores da graduação **MSc. Jaqueline Souza e MSc. Luciano Martins**, juntamente com a discente **MSc. Diana Mota** pela ajuda prestada para ingressar no PPGIBA. Agradeço pelos momentos de atenção e carinho.*

*A **Dra. Aya Sadahiro**, por todo o conhecimento passado ao longo das disciplinas. Em especial, agradeço pela brilhante orientação durante o Estágio de Docência, onde pude ter um grande exemplo de amor a essa linda profissão que é ser professor.*

*Ao **Edson Brazão**, simplesmente o melhor assistente administrativo. Agradeço por toda paciência nas inúmeras vezes que o acionei para esclarecer minhas dúvidas. Sou grato por todo carinho e ajuda ao longo do mestrado.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, seus **Docentes e Técnicos** pelos valiosos ensinamentos e pela oportunidade de qualificação profissional.*

*A **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** pela oportunidade de cursar o mestrado na linda e apaixonante área da Imunologia.*

*A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, pela concessão da bolsa de mestrado, financiamento do projeto e, pelo apoio e incentivo a pesquisa.*

*A **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** e ao **IRR-Fiocruz Minas** por ceder a estrutura e equipamentos necessários para a execução dessa importante pesquisa.*

*Ao **Departamento de Ensino e Pesquisa e Laboratório de Genômica** da Fundação HEMOAM por nos proporcionar um excelente local de estudo, por todo suporte e atenção.*

*Aos **Alunos de Iniciação Científica** do braço da Imunologia das Leucemias, pelas reuniões, discussões e pelo companheirismo.*

*A todos os **Pacientes** do estudo, bem como seus **Responsáveis**, por permitirem a utilização das amostras biológicas. Sem eles esta pesquisa não seria realizada.*

Gratidão!

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para terra, sua mãe”

Leonardo da Vinci

RESUMO

As Microvesículas (MVs) correspondem a um grupo heterogêneo de vesículas derivadas de membrana plasmática, liberadas por células normais e células cancerosas. Sua presença em fluidos biológicos pode ser associada com a gravidade de processos patológicos, tendo destacado seu papel como potenciais biomarcadores de doenças e alvos terapêuticos. Dessa forma, o presente estudo buscou caracterizar o perfil de MVs circulantes em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) *de novo* submetidos a quimioterapia de remissão. Trata-se de um estudo descritivo, do tipo longitudinal retrospectivo, realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) em parceria com o Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB) do Instituto Rene Rachou (IRR) - Fiocruz Minas. A partir de amostras armazenadas no biorrepositório do Laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM, foram selecionadas 10 amostras de medula óssea (MO) e 10 amostras de sangue periférico (SP) de pacientes pediátricos com LLA-B coletadas em três momentos da terapia de indução da remissão, referidos como: dia do diagnóstico (D0), dia 15 (D15) e final da terapia de indução da remissão (D35). Também foram selecionadas 10 amostras de SP de crianças sem leucemia, em tempo único. Posteriormente, as amostras foram enviadas ao IRR, junto ao GIPB, onde foi realizado a caracterização imunofenotípica de MVs derivadas neutrófilos (MVs-NEU), monócitos (MVs-MON), linfócitos T (MVs-LT), eritrócitos (MVs-E), plaquetas (MVs-P), células endoteliais (MVs-CE) e células leucêmicas (MVs-CL) através da técnica de citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que os pacientes com LLA-B apresentaram um aumento significativo de MVs-CE, juntamente com MVs-CL CD10⁺ em comparação ao grupo controle. Em adição, a avaliação da cinética de MVs circulantes durante a terapia de indução demonstrou um declínio significativo de MVs-CL com fenótipo CD10⁺ e CD19⁺ ao D35. Por fim, através de redes integrativas, foi demonstrado que os pacientes com LLA-B exibem ao D35 uma rede rica em interações entre as populações de MVs, perfil oposto ao D0. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve os percentuais e a cinética de MVs circulantes derivadas de leucócitos inflamatórios e CLs em pacientes com LLA-B.

Palavras-chave: leucemia infantil; vesículas extracelulares; microambiente leucêmico; citometria de fluxo; biomarcadores.

ABSTRACT

Microvesicles (MVs) correspond to a heterogeneous group of vesicles derived from plasma membrane, released by normal cells and cancer cells. Their presence in biological fluids can be associated with the severity of pathological processes, having highlighted their role as potential biomarkers of diseases and therapeutic targets. Thus, the present study sought to characterize the profile of circulating MVs in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) pediatric patients *de novo* submitted to remission chemotherapy. This is a descriptive, longitudinal retrospective study, carried out at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) in partnership with the Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB) of the Instituto Rene Rachou (IRR) - Fiocruz Minas. From samples stored in the biorepository of the Multidisciplinary Laboratory of the Fundação HEMOAM, 10 bone marrow (BM) samples and 10 peripheral blood (PB) samples from B-ALL patients collected at three moments of remission induction therapy were selected, referred to as: day of diagnosis (D0), day 15 (D15) and end of remission induction therapy (D35). In addition, 10 PB samples from children without leukemia were also selected (single time point). Subsequently, the samples were sent to the IRR, with the GIPB, where the was carried out immunophenotypic characterization of MVs derived from neutrophils (NEU-MVs), monocytes (MON-MVs), T lymphocytes (TL-MVs), erythrocytes (E-MVs), platelets (P-MVs), endothelial cells (EC-MVs) and leukemic cells (LC-MVs) using the flow cytometry. Our results demonstrated that B-ALL patients had a significant increase in EC-MVs, along with LC-MVs CD10⁺ compared to the control group. In addition, the evaluation of the kinetics of circulating MVs during induction therapy demonstrated a significant decline in LC-MVs with phenotype CD10⁺ and CD19⁺ at D35. Finally, through integrative networks at D35, it was demonstrated that B-ALL patients exhibit a network rich in interactions between MVs populations, profile opposite to D0. As far as we know, this is the first study that describes the levels and kinetics of circulating MVs derived from inflammatory leukocytes and LCs in B-ALL patients.

Keywords: childhood leukemia; extracellular vesicles; leukemic microenvironment; flow cytometry; biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de Hematopoiese na LLA-B.....	8
Figura 2. Células Estromais e Nichos do compartimento medular ósseo.....	13
Figura 3. Esquema da transferência de RNAs por VEs.....	15
Figura 4. Populações de VEs.....	17
Figura 5. Papel das VEs na apresentação de antígeno.....	19
Figura 6. Estrutura e componentes de MVs.....	20
Figura 7. Biogênese de Microvesículas.....	21
Figura 8. Interação e fusão das MVs com as células alvos.....	24
Figura 9. Influência de MVs e EXOs no microambiente leucêmico.....	25
Figura 10. Fluxograma de obtenção das amostras.....	35
Figura 11. Fluxograma de seleção das amostras.....	36
Figura 12. Estratégia para imunofenotipagem de MVs por citometria de fluxo.....	37
Figura 13. Níveis de MVs circulantes no sangue periférico e medula óssea dos pacientes com LLA-B.....	40
Figura 14. Cinética de MVs circulantes nos pacientes com LLA-B durante a terapia de indução da remissão.....	41
Figura 15. Rede de MVs circulantes nos pacientes com LLA-B durante a terapia de indução da remissão.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T.....	9
Tabela 2. Classificação da LLA, segundo a OMS.....	10
Tabela 3. Critérios de estratificação de risco no diagnóstico, de acordo com o GBTLI LLA-2009.....	11
Tabela 4. Painel para imunofenotipagem das populações de MVs.....	37
Tabela 5. Características sociodemográficas e hematológicas da população de estudo.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
APOs	Corpos Apoptóticos
ARF6	Fator de Ribosilação do ADP 6
AR	Alto Risco
BR	Baixo Risco
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CALLA	Antígeno Comum de Leucemia Linfoblástica Aguda
CDs	<i>Cluster Differentiation</i>
CSDMs	Células Supressoras Derivadas de Mieloide
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEs	Células Endoteliais
CEMOs	Células Estromais da Medula Óssea
CLs	Células Leucêmicas
CTHs	Células-Tronco Hematopoiéticas
CRs	Células Reticulares
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
D0	Dia do Diagnóstico do protocolo GBTLI LLA-2009
D8	Dia 8 da terapia de indução da remissão do protocolo GBTLI LLA-2009
D15	Dia 15 da terapia de indução da remissão do protocolo GBTLI LLA-2009
D35	Final da terapia de indução da remissão do protocolo GBTLI LLA-2009
DC	Célula Dendrítica
EMV	Endossoma multi-vesicular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESCRT	Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte
EXOs	Exossomos
FAB	Grupo Francês-Americano-Britânico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fosfatidilserina
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
GIPB	Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores
GP	Glicoproteínas
Hb	Hemoglobina
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
ICOSL	Ligante do Coestimulador Induzível de Células T
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do Receptor da Interleucina-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LPS	Lipopolissacarídeo

MEC	Matriz Extracelular
MGR	Mudança de Grupo de Risco
MO	Medula Óssea
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MT1-MMP	Metaloproteinase de Matriz Tipo 1 da Membrana
MVs-CE	Microvesículas derivadas de Células Endoteliais
MVs-CLs	Microvesículas derivadas de Células Leucêmicas
MVs-E	Microvesículas derivadas de Eritrócitos
MVs-L	Microvesículas derivadas de Leucócitos
MVs-LIN	Microvesículas derivadas de Linfócitos
MVs-MAC	Microvesículas derivadas de Macrófagos
MVs-MON	Microvesículas derivadas de Monócitos
MVs-NEU	Microvesículas derivadas de Neutrófilos
MVs-P	Microvesículas derivadas de Plaquetas
NK	Natural Killer
NKG2D	Natural Killer grupo 2, membro D
NKG2DL	Natural Killer grupo 2, membro D Ligante
OGs	Oncossomas Grandes
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PCR	Proteínas C Reativa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PECAM-1	Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária 1
Ph ⁺	Philadelphia positivo
PLP	Plasma Livre de Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
RCC	Remissão Clínica Completa
RHC	Registro Hospitalar de Câncer
SAME	Setor de Atendimento Médico e Estatístico
SIVE	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
SG	Sobrevida Geral
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
TA	Temperatura Ambiente
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thelper	T auxiliar
Treg	T regulatório
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
VEs	Vesículas Extracelulares
VEs-CC	Microvesículas derivadas de Células Cancerosas
VILs	Vesículas intra-luminais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B	7
2.1.1 Incidência e Etiopatogenia.....	7
2.1.2 Diagnóstico e Classificação	8
2.1.3 Características clínicas	10
2.1.4 Protocolo de Tratamento	11
2.2 COMPARTIMENTO MEDULAR ÓSSEO	12
2.2.1 Microambiente Normal	12
2.2.2 Microambiente Leucêmico	14
2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	14
2.3.1 Descoberta e estudo das VEs	14
2.3.2 Classificação das VEs.....	16
2.3.3 Papel das VEs na regulação imunológica.....	17
2.4 MICROVESÍCULAS	19
2.4.1 Estrutura, Biogênese e Liberação de MVs	19
2.4.2 Navegação, Interação e Fusão de MVs	22
2.4.3 MVs derivadas de Células Leucêmicas	24
2.4.4 MVs derivadas de Leucócitos inflamatórios	26
2.4.5 MVs derivadas de Células Endoteliais	28
2.4.6 MVs derivadas de Plaquetas	29
2.4.7 MVs derivadas de Eritrócitos.....	30
2.4.8 MVs como biomarcadores Imunológicos.....	31
3. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral.....	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Aspectos Éticos	33
5.2 Modelo de estudo	33
5.3 População de estudo	33

5.4	Critérios de inclusão e exclusão	33
5.5	Obtenção das amostras	34
5.6	Seleção das amostras	35
5.7	Imunofenotipagem de Microvesículas	36
5.8	Obtenção dos dados sociodemográficos e clínicos-hematológicos	38
5.9	Análise dos dados.....	38
6.	RESULTADOS	39
6.1	Características da população de estudo	39
6.2	Perfil de MVs circulantes em pacientes com LLA-B ao diagnóstico	40
6.3	Cinética de MVs circulantes durante a terapia de indução da remissão.....	41
6.4	Rede biológica de MVs circulantes durante a terapia de indução da remissão 42	
7.	DISCUSSÃO	43
8.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	45
9.	CONCLUSÃO	45
10.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	45
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12.	ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna hematológica caracterizada pela proliferação anormal de progenitores linfóides (linfoblastos) na medula óssea (MO), com liberação no sangue periférico (SP) e locais extramedulares. Devido a mutações, estas células sofrem alterações nos mecanismos de diferenciação e apoptose, proliferam-se descontroladamente e comprometem a produção de células sanguíneas (1). Nos últimos anos, o papel do microambiente tumoral na progressão de neoplasias hematológicas tem sido amplamente investigado (2,3).

No compartimento hematopoiético, as células estromais compõem a maior fonte de citocinas e fatores de crescimento, proporcionando uma rede de sinalização essencial para a homeostase do microambiente da MO (4,5). No entanto, na leucemia, é observado que as células leucêmicas (CLs) podem secretar estruturas vesiculares originadas a partir da membrana plasmática, denominadas microvesículas (MVs), que induzem alterações nos nichos do microambiente medular. Além disso, as MVs podem reprogramar e apoiar a persistência leucêmica e o potencial metastático, através da estimulação de processos como o crescimento celular, angiogênese e fuga de CLs da resposta imunológica (6,7).

Em função de sua capacidade de conter um subconjunto de moléculas e antígenos específicos da célula parental, além de exercer papéis importantes em processos vitais das CLs, as MVs podem ser propostas como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, especialmente aquelas derivadas de CLs, uma vez que estas contém informações exclusivas relacionadas ao estado de malignidade, tipo celular e suscetibilidade a tratamentos terapêuticos. Assim, a identificação de biomarcadores oriundos de MVs podem fornecer novos alvos para o monitoramento e prognóstico de pacientes com leucemia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B

2.1.1 Incidência e Etiopatogenia

A leucemia corresponde ao 15º tipo de câncer de maior incidência no mundo, apresentando 2,4% de todos os casos novos de câncer (8,9). No Brasil, nos últimos anos, houve um aumento expressivo na incidência de leucemia, representando atualmente o 9º câncer mais comum (10). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de leucemia esperados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (11).

A proporção de casos de leucemia entre as regiões do Brasil é variável e tem aumentado desde os últimos relatórios do INCA (10–12). A região Norte foi identificada como a região com o segundo maior número casos de leucemia, tendo o Amazonas, particularmente sua capital Manaus, classificada em 2010 como a capital com a segunda maior taxa de incidência ajustada à idade (abaixo de 14 anos) de leucemia em crianças e adolescentes (13–15). Em 2011, teve a maior taxa de incidência no país, com 76,8 casos de leucemia por milhão de habitantes, aumentando em 2016 para 87,1 (16–18).

Dentre as leucemias agudas da infância, a Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) destaca-se por ser a neoplasia pediátrica de maior ocorrência no mundo, representando 25% de todas as neoplasias infantis entre crianças menores de 15 anos. Embora possa ocorrer em indivíduos de todas as idades, possui maior incidência entre crianças de dois a três anos, com uma ligeira predominância no sexo masculino. Dentre os subtipos de LLA, destaca-se a Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B), representando 80% de todos os casos neste segmento (19).

A LLA-B é um câncer hematológico caracterizada pela superprodução de linfócitos B imaturos na medula óssea (MO), com liberação do sangue periférico (SP) e locais extramedulares, como linfonodos, testículos e sistema nervoso central (SNC). Devido a uma série de mutações, estas células sofrem alterações nos mecanismos de diferenciação e apoptose, proliferam-se descontroladamente e substituem as populações de células maduras da linhagem linfoide e mieloide, resultando na tríade da leucemia caracterizada por anemia, neutropenia e trombocitopenia (Figura 1) (1,20).

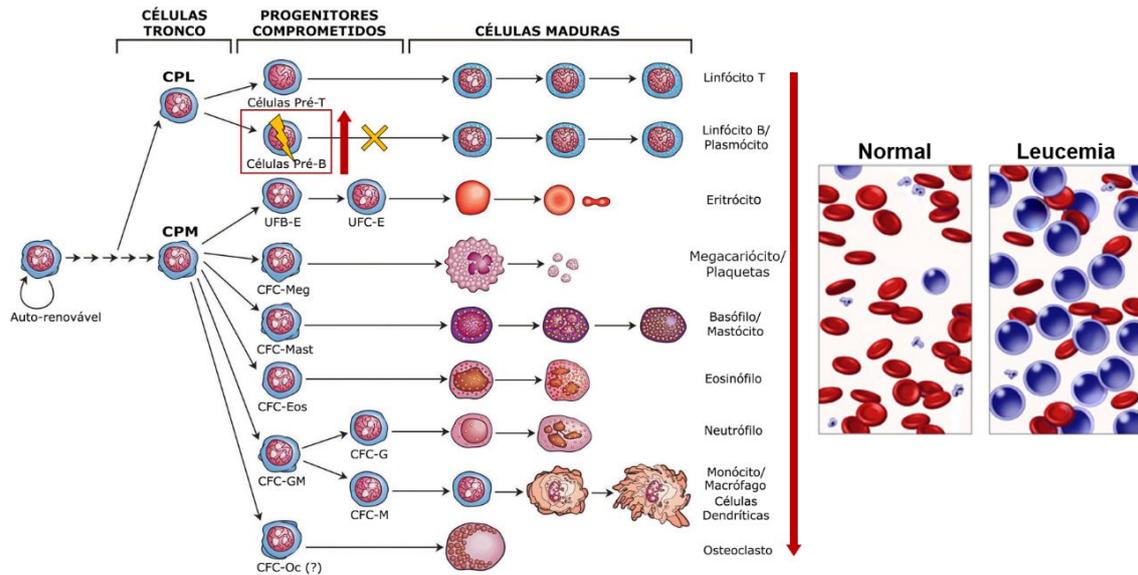


Figura 1. Processo de Hematopoiese na LLA-B. Demonstração do bloqueio na diferenciação da célula progenitora linfóide, resultando na superprodução de linfoblastos, com subsequente diminuição no desenvolvimento e diferenciação das demais linhagens hematopoiéticas.

Fonte: Adaptado de mountnittanyhealth.org

Embora sua etiologia permaneça desconhecida, estudos tem associado sua manifestação a anomalias congênitas (Síndrome de Down, Síndrome Bloom, Anemia de Fancone e Neurofibromatose), exposição ocupacional materna a produtos químicos e radiação ionizante, que coletivamente explicam menos de 10% dos casos (1,21,22). Outras evidências sugerem que recém-nascidos que desenvolvem leucemia durante a primeira infância, podem apresentar uma expressão constitutivamente menor de IL-10 ao nascimento e uma propensão a reagir a infecções normais de uma maneira hipersensível, especialmente durante o primeiro ano de vida, o que pode induzir uma progressão de clones pré-leucêmicos por meio de processos inflamatórios relacionados à infecção (23).

2.1.2 Diagnóstico e Classificação

O diagnóstico e a classificação da LLA baseia-se, na análise morfológica e citoquímica das células neoplásicas, com a subsequente avaliação dos imunofenótipos através de citometria de fluxo, permitindo avançar na identificação de determinados subgrupos dificilmente classificáveis do ponto de vista morfológico (24).

O hemograma pode revelar um quadro de pancitopenia, com anemia normocítica e normocrômica e trombocitopenia. A contagem de leucócitos encontra-se frequentemente diminuída, no entanto, ocasionalmente pode apresentar-se elevada (25).

Contudo, o diagnóstico da LLA fundamenta-se a partir do mielograma, a partir de uma contagem igual ou superior a 20% de linfoblastos na MO, que encontra-se hiper celular com substituição dos espaços adiposos e elementos medulares normais por células leucêmicas (CLs), com precursores mieloides e eritroides residuais de aspecto normal e megacariócitos diminuídos ou ausentes (25).

Embora a morfologia e citoquímica forneçam informações sobre os linfoblastos e sejam importantes no diagnóstico e na definição do tipo de leucemia, elas não permitem a identificação da linhagem celular comprometida (26,27). A identificação imunológica de antígenos de superfície, citoplasmáticos e nucleares, também conhecidos como *Cluster of differentiation* (CD) presentes nos blastos permitem identificar o estágio de maturação da célula transformada, ou seja, associar o estágio de diferenciação de células progenitoras linfoides imaturas aos estágios iniciais de desenvolvimento dos linfócitos T normais (27,28). Dessa forma, a LLA é subdividida fenotipicamente em linhagem B (LLA Pró-B, LLA B Intermediário/Comum, LLA Pré-B, LLA B Madura), e linhagem T (LLA Pró-T, LLA Pré-T, LLA T Cortical, e LLA T Medular) (Tabela 1) (25).

Tabela 1. Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T.

Linhagem B	CD10	CD19	CD22	CD79a	Tdt	Ig
Pró-B	-	+	+	+	+	-
B Comum	+	+	+	+	+	-
Pré-B	±	+	+	+	+	C-mu
B Madura	±	+	+	+	±	+
Linhagem T	CD1a	CD2	CD3	CD4	CD7	CD8
Pró-T	-	-	C	-	+	-
Pré-T	-	+	C	-	+	-
T Cortical	+	+	C	+	+	+
T Medular	-	+	C,S*	±	+	±

Abreviações: Tdt, desoxinucleotidil transferase terminal; Ig, imunoglobulina; C, citoplasmático; S, superfície; +, expressão do antígeno; ±, expressão variável, frequentemente positiva; -, ausência de expressão do antígeno; *Linfócitos T medular são positivos apenas para CD4 ou CD8, mas não ambos. Fonte: Adaptado de McGregor et al., 2012 (29).

Nos últimos anos, houve também um grande avanço no campo da biologia molecular, ajudando a compreender melhor a doença e definindo com mais rigor a sua classificação. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Grupo Francês-Americano-Britânico (FAB), a LLA é classificada com base nas características citomorfológicas, expressão de antígenos de superfície celular, além de alterações

genéticas e moleculares as quais estão relacionadas com o prognóstico da doença (30,31).

Em 2008, a LLA de células B ou T foi subclassificada pela OMS de acordo com as alterações genéticas, sendo realizada em 2016 a mais recente revisão (Tabela 2). Na classificação da LLA-B há vários subtipos geneticamente caracterizados, como as translocações t(9;22) ou t(12;21), rearranjos no gene *MLL* ou alterações no número de cromossomos (aneuploidia). O subtipo apresenta-se como fator importante para escolha do melhor protocolo de tratamento e prognóstico (32).

Tabela 2. Classificação da LLA, segundo a OMS.

Leucemia Linfoblástica B

Leucemia Linfoblástica B, NES

Leucemia Linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes

Leucemia Linfoblástica B com t (9; 22) (q34;q11.2); *BCR-ABL1*

Leucemia Linfoblástica B com t (v; 11q23); *MLL* rearranjado

Leucemia Linfoblástica B com t (12; 21) (p13; q22); *TEL-AML1* (ETV6-RUNX1)

Leucemia Linfoblástica B com hiperdiploidia

Leucemia Linfoblástica B com hipodiploidia (LLA hipodiploide)

Leucemia Linfoblástica B com t (5; 14) (q31.1; q32.3); *IL3-IGH*

Leucemia Linfoblástica B com t (1; 19) (q23; p13.3); *TCF3-PBX1*

Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica B, semelhante a BCR-ABL1

Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica B com iAMP21

Leucemia Linfoblástica T

Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica precursora de células T precoce

Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica de células natural killer

Abreviações: NES, não especificada separadamente.

Fonte: Adaptado de Abner et al., 2016 (33).

2.1.3 Características clínicas

Os aspectos clínicos da LLA-B decorrem de duas principais consequências da proliferação leucêmica: a insuficiência da MO, que reflete na tríade da leucemia caracterizada por anemia, granulocitopenia e trombocitopenia, o que resulta em sintomas como fadiga, dispneia, febre, infecções graves, sangramentos ou hematomas; E a infiltração leucêmica, que pode envolver o SNC, testículos, linfonodos, fígado, baço, mediastino, além de, olhos e outros sítios extramedulares (1,34–36).

2.1.4 Protocolo de Tratamento

O tratamento convencional da LLA é realizado através da combinação de medicamentos quimioterápicos, buscando a eliminação das células leucêmicas, com o objetivo de estabelecer um novo crescimento saudável de células sanguíneas. No Brasil, a partir da década de 80, com a implementação de protocolos nacionais, foram obtidos melhores resultados no tratamento da LLA infantil. Em 1993, Brandalise e colaboradores iniciaram o primeiro protocolo multicêntrico de tratamento de LLA infantil, formando assim o Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI). Desde então, quatro estudos foram realizados e concluídos (1982, 1985, 1993, 1999) (37).

No ano de 2009, o GBTLI apresentou uma nova proposta de tratamento onde estratifica os grupos terapêuticos em baixo risco (BR) e alto risco (AR) com base em fatores de prognóstico. Dados brasileiros do estudo GBTLI LLA-2009 revelam que, em sete anos de seguimento, a taxa de sobrevida livre de eventos de crianças tratadas pelo protocolo foi de aproximadamente 76,3% para o grupo BR e 59,8% para o grupo AR (38).

Atualmente na Fundação HEMOAM, o tratamento específico da LLA-B segue o protocolo GBTLI LLA-2009. O mesmo, é distribuído em 6 fases, sendo elas: Terapia de Pré-fase; Terapia de Indução da Remissão; Terapia de Consolidação da Remissão; Fase de Intensificação; Fase da Consolidação Tardia e; Fase de Manutenção (Anexo I).

Dentre as fases do tratamento, a terapia de indução da remissão apresenta-se como uma etapa de fundamental importância para o prognóstico do paciente, cujo objetivo consiste em alcançar a remissão clínica completa (RCC) em 4 semanas. Tal etapa, utiliza como critérios de estratificação de risco ao diagnóstico, fatores como: idade, contagem leucocitária, acometimento do SNC e análise citogenética de anormalidades cromossômicas de alto risco (Tabela 3), visando a identificação da melhor dosagem da combinação dos medicamentos quimioterápicos a serem utilizados (Anexo I) (28).

Tabela 3. Critérios de estratificação de risco no diagnóstico, de acordo com o GBTLI LLA-2009.

Parâmetro de risco	Baixo risco (BR)	Alto risco (AR)
<i>Idade</i>	≥ 1 e <9	<1 ou ≥ 9
<i>Leucócitos</i>	$<50.000 / \text{mm}^3$	$\geq 50.000 / \text{mm}^3$
<i>Linfoblastos no SNC</i>	Ausente	Presente
<i>Citogenética</i>	Ausência de achados citogenéticos de AR	Presença de achados citogenéticos de AR t(9;22) BCR/ABL ou t(4;11) MLL/AF4

Fonte: Adaptado de Salina et al., 2016 (38).

Posteriormente, a estratificação dos pacientes nos grupos BR e AR de recidiva é baseada na resposta terapêutica avaliada no 8° dia (D8) através da contagem de blastos no SP, no 15° dia (D15) através da citologia da MO e avaliação da doença residual mínima medida por citometria de fluxo e, no 35° dia (D35) através da citologia da MO e doença residual mínima medida por citometria de fluxo e PCR (Anexo II) (39). Tal análise é realizada com o objetivo de avaliar a resposta do paciente ao tratamento quimioterápico, indicando a necessidade de possíveis mudanças de grupos de risco e/ou de protocolo de tratamento, além de possíveis estratégias terapêuticas visando o aumento na sobrevida livre de doença (40).

Inúmeros fatores foram responsáveis pelo aumento da taxa de sobrevida, incluindo avanços nos métodos de diagnóstico, estabelecimento de fatores prognósticos, utilização de protocolo de tratamento ajustado por dose para os grupos de risco de recaída e melhorias no suporte clínico, resultando assim numa taxa de sobrevida livre de doença em pacientes pediátricos com LLA, de 80-85% nos países desenvolvidos (41).

2.2 COMPARTIMENTO MEDULAR ÓSSEO

2.2.1 Microambiente Normal

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) dependem fortemente de interações locais no compartimento medular com células estromais da medula óssea (CEMOs) e outras células hematopoiéticas. Estas, facilitam sua sobrevivência e modulam suas funções através da produção sistemática de mediadores, compostos por citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão e sinais intracelulares (2,42).

As CEMOs abrangem uma variedade de populações celulares (Figura 2A), que incluem osteoblastos, neurônios simpáticos e células de Schwann não mielinizantes, células T regulatórias (Tregs), células reticulares (CRs) abundantes em CXCL12, células endoteliais (CEs), células estromais perivasculares, além de células-tronco mesenquimais (CTMs), que são fundamentais na formação de microambientes especializados, amplamente referidos como "nichos" (42,43). Dois nichos distintos foram identificados no compartimento medular, definidos como nicho "endosteal (osteoblástico)" e nicho "vascular (central)" (Figura 2B) (44,45).

O nicho osteoblástico, localizado na superfície interna da cavidade óssea (endóstio) e com vários osteoblastos formadores de ossos, fornece um microambiente para CTHs de longo prazo, capaz de contribuir para a hematopoiese como células quiescentes ou de ciclo lento (46–49). O nicho vascular, que consiste predominantemente de células endoteliais sinusoidais que revestem os vasos sanguíneos, promove a proliferação e diferenciação do ciclo ativo, para CTHs de curto prazo (50). De modo geral, a coordenação entre os nichos modula a auto-renovação, proliferação, diferenciação e mobilização de CTHs dentro e fora do compartimento medular (6).

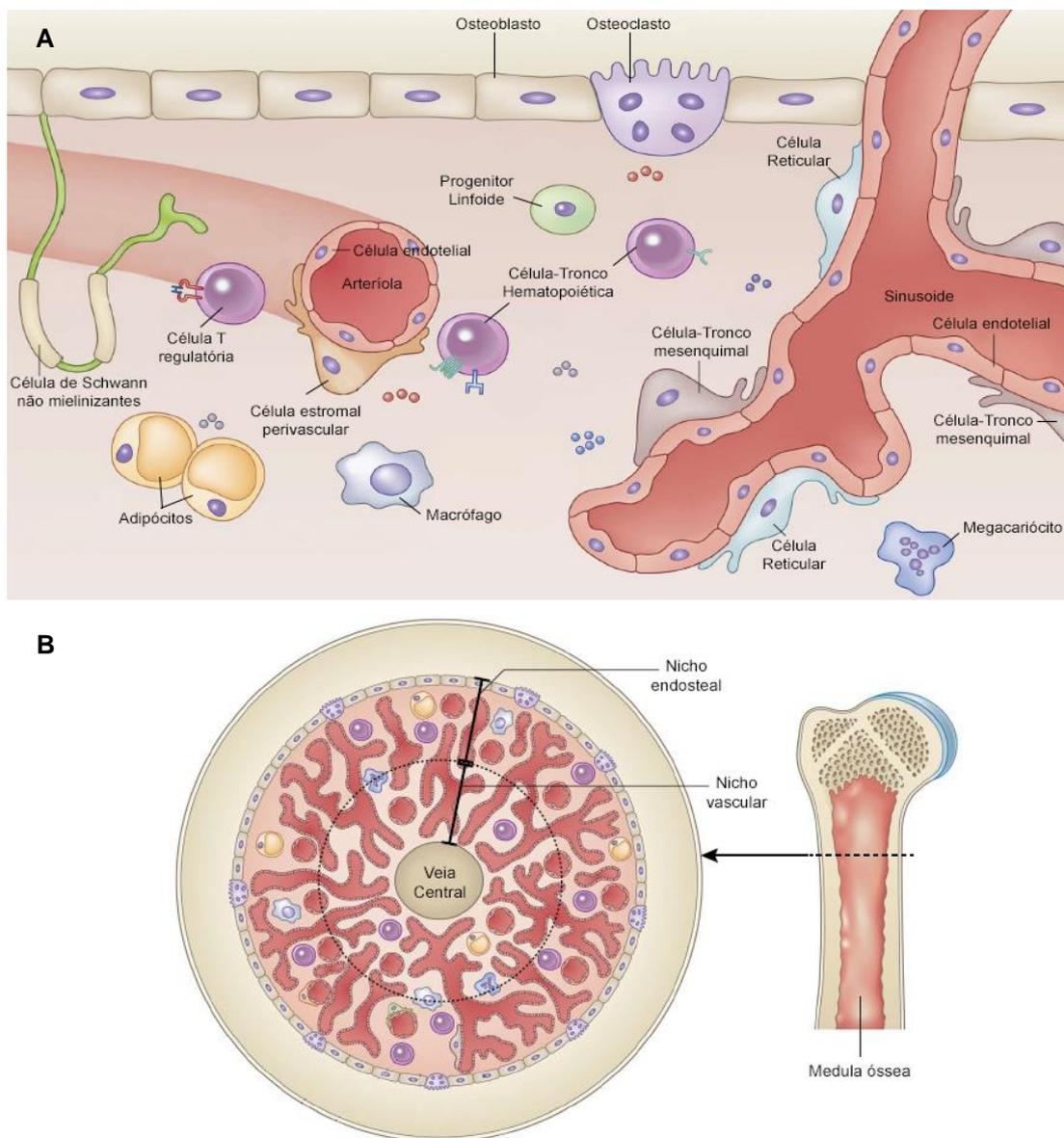


Figura 2. (A) Células Estromais do compartimento medular ósseo. Várias populações de CEMOs estão envolvidas na promoção da manutenção de CTHs, estas incluem: osteoblastos, osteoclastos, adipócitos, CRs, CEs, CTMs, células estromais perivasculares, células de Schwann não mielinizantes, Tregs e macrófagos. (B) Nichos do compartimento medular ósseo. Dois nichos distintos compõem o

microambiente da MO, o Nicho endosteal ou osteoblástico, localizado na superfície interna da cavidade óssea (endóstio), e o Nicho vascular ou central, localizado na região central da MO.

Fonte: Adaptado de Mendelson, 2014 (45).

2.2.2 Microambiente Leucêmico

De maneira similar as CTHs, as CLs permanecem pelo menos parcialmente dependentes dos sinais regulatórios provenientes do microambiente hematopoiético para sua sobrevivência e proliferação (3). No entanto, as CLs perturbam os nichos normais do compartimento medular, através da liberação de vários fatores, dentre eles, vesículas extracelulares (VEs). Essas estruturas membranosas reprogramam populações de células estromais, que induzem alterações no microambiente da MO, resultando na transformação de nichos saudáveis em nichos "leucêmicos" (7,51).

A reprogramação dos nichos da MO contribuem para persistência leucêmica, promovendo a quimiorresistência, quiescência e inibição de apoptose nas CLs, além de influenciar no desenvolvimento e diferenciação de outras linhagens na hematopoiese, visando aumentar a sobrevivência e expansão de CLs (52–56). Nos últimos cinco anos, estudos demonstraram que as VEs representam um componente eminente no microambiente tumoral, mediando a comunicação entre CLs e células circundantes. Atualmente são consideradas importantes contribuintes para a progressão do câncer (57).

2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES

2.3.1 Descoberta e estudo das VEs

A história das VEs teve início em 1946, através das observações de Chargaff e West, que relataram que a centrifugação prolongada do plasma humano (31.000 ×g por 150 minutos) resultou no aumento do tempo de coagulação devido à perda do “fator de coagulação” (58). Em 1967, Peter Wolf identificou vesículas derivadas de plaquetas, referidas como “pó de plaquetas”. Tal trabalho, é considerado por muitos autores um marco na pesquisa sobre VEs (59).

Nas décadas de 1970-80, foram observadas a liberação de vesículas da membrana plasmática de células microvilosas de adenoma retal (60), relatos de partículas semelhantes a vírus em culturas de células humanas e soro bovino (61,62), além da detecção de vesículas, posteriormente denominadas prostassomas, no plasma seminal

(63,64). Na mesma época, foram feitas as primeiras observações de fragmentos de membrana originários de tumores, que também mostraram-se pró-coagulantes (65,66).

Em 1983, estudos ultraestruturais detalhados mostraram que as vesículas também são liberadas por corpos multivesiculares (CMVs) que se fundem com a membrana celular durante a diferenciação de glóbulos vermelhos imaturos (67–69). Mais de uma década depois, Raposo e Nijman demonstraram que essas vesículas, então denominadas exossomos, isolados de linfócitos B transformados pelo vírus Epstein-Barr, apresentavam antígenos e eram capazes de induzir respostas de células T (70).

Entre 2006 e 2007, com a descoberta de que as VEs, especialmente exossomos (EXOs) e microvesículas (MVs), transportam e transferem material genético (DNA e RNAs) (Figura 3), reforçaram a importância dessas vesículas e proporcionaram um novo interesse das VEs como mediadores de comunicação celular (71,72). Pouco depois, foi observado que as VEs estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo coagulação, inflamação, expansão de células-tronco, comunicação neuronal, tumorigênese, entre outros (73–75).

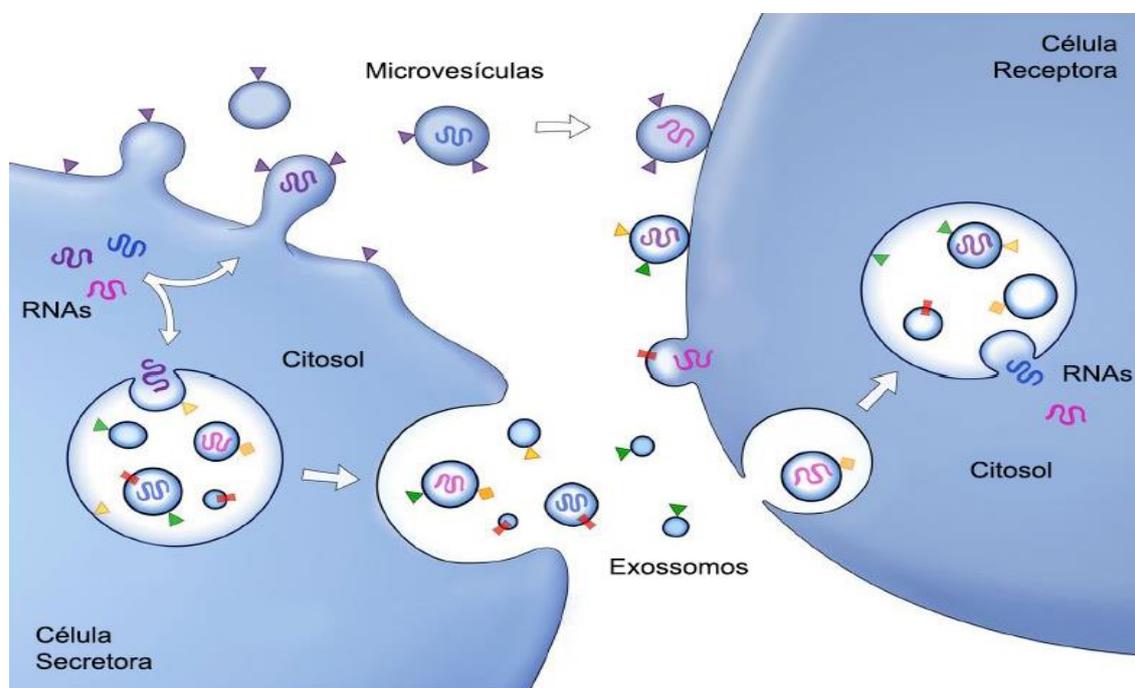


Figura 3. Esquema da transferência de RNAs por VEs. As moléculas de RNAs (símbolos curvos) incorporadas em MVs e EXOs podem atracar na membrana plasmática de uma célula receptora. As vesículas ligadas podem se fundir diretamente com a membrana plasmática ou ser endocitadas e, então se fundir com a membrana delimitadora de um compartimento endocítico. Ambas as vias resultam na entrega de RNA na membrana ou citosol da célula receptora.

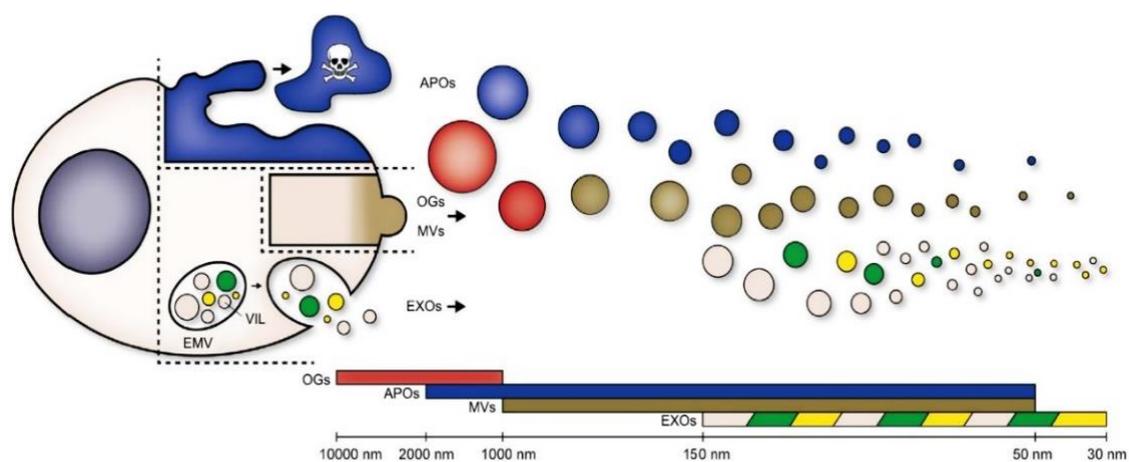
Fonte: Adaptado de Raposo, 2013 (76).

Hoje as VEs foram isoladas da maioria dos tipos celulares e fluidos biológicos, como saliva, urina, líquido de lavagem nasal e brônquico, líquido amniótico, leite materno, plasma, soro e fluido seminal (77–82). Um expressivo progresso no campo das VEs foi resultante de trabalhos colaborativos desenvolvidos pelos membros da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (SIVE), visando padronizar a nomenclatura e metodologias utilizadas nos estudos. Em 2014, a SIVE publicou um documento sobre requisitos experimentais para a caracterização das VEs e suas funções, apresentando etapas básicas de pesquisa necessárias para obtenção de resultados precisos (83,84).

2.3.2 Classificação das VEs

As VEs compreendem um grupo variado e heterogêneo de populações de vesículas derivadas de membranas celulares, classificadas de acordo com seu tamanho, que pode variar de nano a micro, além da origem (Figura 4). Atualmente, pelo menos três subtipos principais de VEs foram definidos (85): os exossomos (EXOs), com um tamanho de 30 a 150 nm diâmetro, originados a partir de vesículas intra-luminais (VILs) do endossoma multivesicular (EMV); as microvesículas (MVs) ou micropartículas/ectossomos, com tamanho variando de 50-1000 nm de diâmetro, geradas pela brotação externa da membrana plasmática; e corpos apoptóticos (APOs) ou vesículas apoptóticas, apresentando entre 1000–2000 nm de diâmetro, liberados como bolhas de células submetidas à apoptose (76,86).

Há ainda, os oncosomas grandes (OGs), que representam uma população de VEs não apoptóticas cuja liberação parece ser exclusiva de células cancerosas, possuem um tamanho atípico entre 1.000-10.000 nm e são originários diretamente da membrana plasmática (87). Todas essas populações de VEs compartilham características em comum, como tamanho nanométrico, composição por bicamadas fosfolipídicas com formato esférico e a presença de proteínas, receptores de membrana e ácidos citosólicos originários de sua célula de origem (88).



Tipo de Vesícula	Tamanho	Origem
● Exossomos (EXOs)	30 - 150 nm	Vesículas Intraluminais (VIL) do Endossoma Multivesicular (EMV)
● Microvesículas (MVs)	50 - 1000 nm	Membrana Plasmática
● Corpos Apoptóticos (APOs)	50 - 2000 nm	Membrana Plasmática
● Oncossomas (OGs)	1000 - 10000 nm	Membrana Plasmática (Células Cancerosas)

Figura 4. Populações de VEs. As células liberam populações de VEs com tamanhos e origens distintos: os APOs (azul) são liberados por células submetidas à apoptose; os OGs (vermelho) e MVs (marrom) são derivados diretamente da membrana plasmática; e os EXOs (verde) são derivados de compartimentos endossômicos intracelulares, mais precisamente de VILs do EMV.

Fonte: Adaptado de Willms, 2018 (89).

Recentemente, a SIVE propôs classificar os VEs com base nas condições de centrifugação em: VEs pequenas - sedimentando a $100.000 \times g$, no lugar de EXOs; VEs médias - sedimentando em velocidades inferiores a $20.000 \times g$, MVs; VEs grandes sedimentando a $2.000 \times g$ (fragmentos de células e corpos apoptóticos). No entanto, como essas recomendações são relativamente novas (2017) (90), a grande maioria dos autores ainda utilizam os termos anteriores, estabelecidos a mais tempo.

2.3.3 Papel das VEs na regulação imunológica

As VEs, incluindo MVs e EXOs, produzidas por células imunes e não imunes possuem papéis importantes na regulação da imunidade. Estas vesículas podem mediar a estimulação ou supressão da resposta imunológica a partir da transferência de cargas bioativas, que incluem principalmente: moléculas proteicas, lipídicas e ácidos nucleicos. Dentre as cargas bioativas transportadas, o ácido nucleico (microRNA, mRNA, RNA e DNA) destaca-se como o principal elemento na regulação de resposta imune (91,92).

Como material genético das células parentais, as moléculas ativas de ácidos nucleicos são responsáveis pela transdução de sinais que regulam a expressão gênica e a

síntese de proteínas nas células-alvo. Estudos revelaram que as VEs afetam a expressão gênica por meio de dois principais mecanismos: através da regulação de microRNAs e, através da transferência de microRNAs, ambos resultam na tradução de proteínas e na reprogramação de células-alvo (91).

Após a transdução diferentes sinais, VEs derivadas de células cancerosas (VEs-CC), por exemplo, podem afetar a proliferação, apoptose, produção de citocinas e reprogramação de células imunes inatas e adaptativas (93–95). VEs-CC enriquecidas com miRNAs, tais como miR-21-3p, miR-125b-5p, miR-181d-5p e miR-1246, são capazes de reprogramar macrófagos circundantes em agentes de suporte de tumor (96,97). Enquanto, VEs-CC que expressam TGF- β 1 e um ligante para NKG2D (NKG2DL) podem regular negativamente a expressão de NKG2D e reduzir a citotoxicidade induzida por células NK (98–100). Além disso, VEs-CC também podem promover a diferenciação de monócitos em células supressoras derivadas de mielóide (CSDMs), que inibem a maturação de células dendríticas (DCs) (101–103).

As VEs também são capazes de regular a resposta imune desempenhando um papel como vesículas apresentadoras de antígenos (92). Estudos demonstraram que as VEs-CC contendo antígenos tumorais nativos podem ser eficientemente internalizadas por DCs, para processamento antigênico e apresentação cruzada para linfócitos T citotóxicos (LTCs) específicos de tumor (104,105). De maneira semelhante, antígenos microbianos também podem estar presentes em VEs, que na presença de DCs, estimulam a imunidade de células T (106).

A apresentação de antígeno por meio das VEs, pode ocorrer através de três maneiras distintas: apresentação direta de antígeno, onde as VEs mantem a topologia das células apresentadoras de antígenos (APCs) de origem, e carregam moléculas de MHC de classe I e II de superfície e, portanto, podem estimular diretamente as células T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente (107–110); apresentação indireta de antígenos por meio da transferência de peptídeos antigênicos para APCs, onde uma fração de VEs captadas é internalizada e, os complexos de peptídeo-MHC transmitidos pelas VEs podem ser usados como uma fonte de peptídeos para interagir indiretamente com as células T (111,112); e apresentação indireta de antígenos via *cross-dressing*, onde complexos de peptídeo-MHC de VEs, são ligados (adsorvidos) às superfícies de APCs e apresentados diretamente às células T sem a necessidade de reprocessamento de peptídeo-MHC (embora as moléculas coestimulatórias sejam fornecidas pela APC) (113,114) (Figura 5).

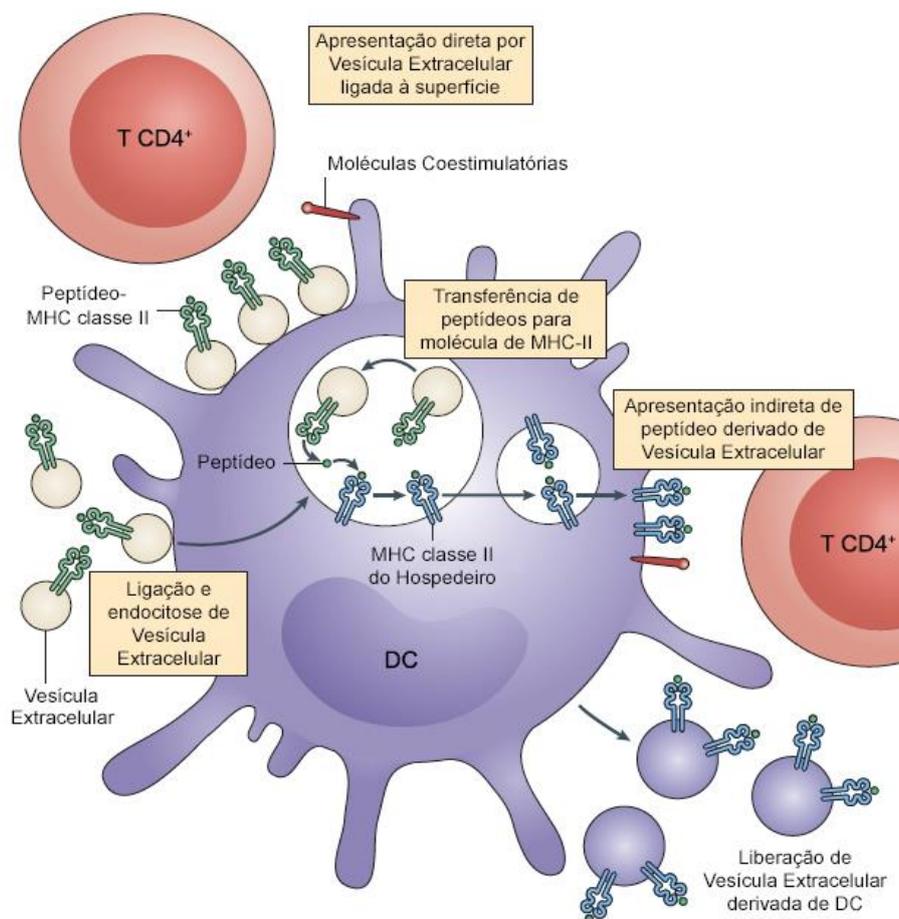


Figura 5. Papel das VEs na apresentação de antígeno. As APCs (por exemplo, DCs) apresentam complexos de peptídeo-MHC que são derivados de VEs exógenas capturadas. As VEs que são retidas na superfície de uma APC apresentam seus complexos peptídeo-MHC diretamente para as células T (embora as moléculas coestimulatórias sejam fornecidas pela APC). Alternativamente, as VEs internalizadas transferem seus peptídeos antigênicos para as moléculas de MHC de uma APC hospedeira. As moléculas de MHC hospedeiras que são carregadas com o peptídeo derivado de VEs exógenas são então transportadas para a superfície da APC para apresentação às células T. As APCs também liberam VEs que podem regular respostas imunológicas específicas. Embora apenas complexos de MHC de classe II sejam mostrados, um processo semelhante ocorre para moléculas de MHC de classe I na regulação de células T CD8⁺.
 Fonte: Adaptado de Robbins, 2014 (92).

2.4 MICROVESÍCULAS

2.4.1 Estrutura, Biogênese e Liberação de MVs

As MVs (também conhecidas como micropartículas ou ectossomos) são vesículas derivadas da membrana plasmática que são liberadas no espaço extracelular por brotamento externo e fissão da membrana plasmática (57). A composição das MVs, depende muito do tipo de célula do qual elas se originam, embora a composição da

membrana conserve-se distinta da célula parental (geralmente com remodelação significativa, possibilitando funções especializadas). Nesse sentido, nem todas as proteínas da membrana plasmática são incorporadas nas MVs (115).

As membranas de MVs contêm altos níveis de colesterol, esfingomiéline, e fosfatidilserina (FS), sendo este último um fosfolípido importante para o funcionamento e a integridade da membrana celular (116). Normalmente distribuído assimetricamente na membrana plasmática, onde é predominantemente encontrado no folheto interno da bicamada da membrana, a FS é realocada para o folheto externo da membrana, especificamente em locais na superfície celular onde ocorre a liberação de MVs, enquanto a topologia das proteínas da membrana permanece intacta (Figura 6) (115,117,118).

As MVs usualmente exibem integrinas, tetraspaninas e receptores em densidade relativamente baixa, além de outras proteínas, como a metaloproteínase de matriz tipo 1 da membrana (MT1-MMP), receptores de glicoproteínas (GPIb e GPIIb/GPIIa) e moléculas de adesão (119,120). Devido a ampla heterogeneidade, algumas dessas proteínas não encontram-se em todas as MVs, sendo presentes apenas em determinadas subpopulações (121). Além das proteínas de membrana, as MVs também carregam proteínas citosólicas, lipídios e ácidos nucleicos, incluindo sequências de DNA e RNA, que incluem mRNA, RNAs não codificantes e principalmente miRNA (Figura 6) (122,123).

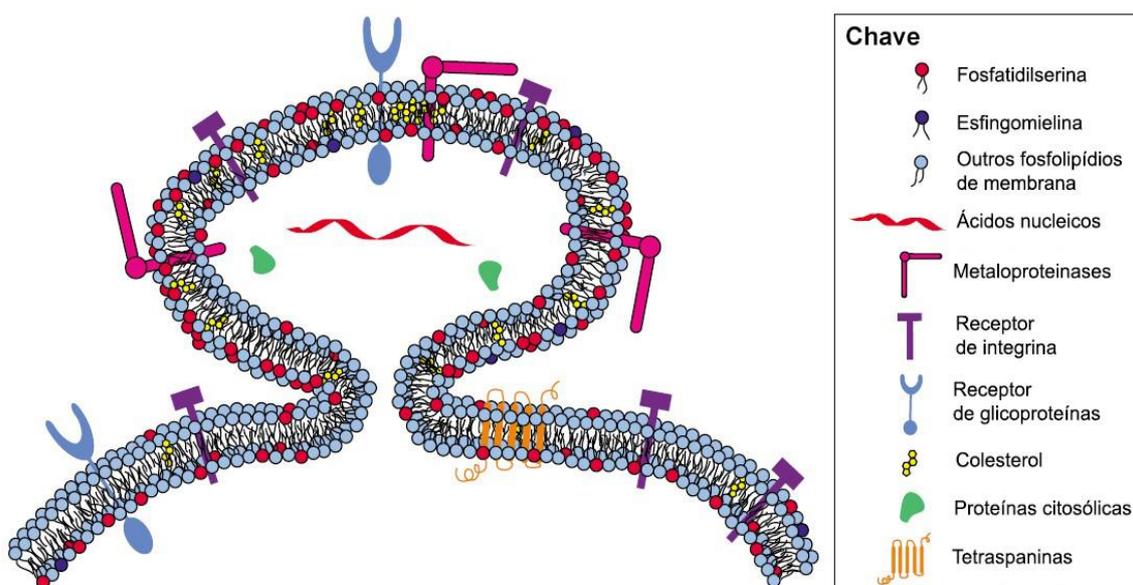


Figura 6. Estrutura e componentes de MVs. As MVs são formadas pela brotação externa da membrana plasmática, as mesmas, são enriquecidas com alguns lipídios, como o colesterol, esfingomiéline, e principalmente a fosfatidilserina, que é realocada para o folheto externo da membrana, em locais onde

ocorre a liberação de MVs. Proteínas de membrana, como receptores de integrinas, receptores de glicoproteínas, tetraspaninas, metaloproteinases e moléculas de MHC, proteínas solúveis como proteases e citocinas, além de ácidos nucleicos, podem ser encontrados nas MVs.

Fonte: Adaptado de Chari, 2010 (57).

A natureza e a abundância de cargas das MVs também variam de acordo com a célula parental e são frequentemente influenciadas pelo estado fisiológico ou patológico da célula doadora, pelos estímulos que modulam sua produção e liberação, e pelos mecanismos moleculares que levam à sua biogênese (124,125). O processo de tráfego de cargas para as MVs ainda é uma área de investigação, sendo bem menos caracterizada, quando comparado aos EXOs.

A formação de MVs envolve o agrupamento de carga, brotamento e fissão para o meio extracelular. Inicialmente, os lipídios e as proteínas associadas à membrana são agrupados em discretos microdomínios (regiões onde ocorre o agrupamento de cargas) na membrana plasmática. Tais microdomínios, juntamente com a maquinaria do complexo de triagem endossomal necessário para transporte (ESCRT)-I, participam do recrutamento de componentes solúveis, como proteínas citosólicas e espécies de RNA.

A formação do agrupamento de microdomínios junto com maquinarias enzimáticas dependentes de cálcio, que inclui translocases de aminofosfolípido (flippases e floppases), ARF6 e ESCRT-III, conduzem rearranjos na assimetria de fosfolipídios de membrana, o que causa flexão física e reestruturação do citoesqueleto de actina subjacente, promovendo o brotamento da membrana seguido por um processo de fissão na membrana plasmática em direção ao meio extracelular (Figura 7) (126–128).

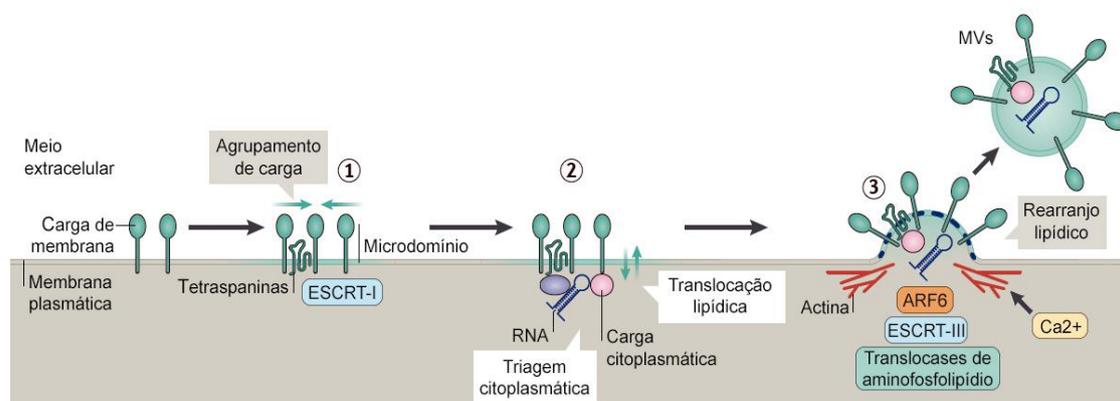


Figura 7. Biogênese de MVs. Inicialmente, lipídios e proteínas associadas à membrana são agrupados em discretos microdomínios da membrana da membrana plasmática (etapa 1). Esses microdomínios, juntamente com a maquinaria ESCRT-I, participam do recrutamento de componentes solúveis, como

proteínas citosólicas e espécies de RNA, destinados à incorporação nas MVs (etapa 2). Ao final, o agrupamento de microdomínios, juntamente com maquinarias adicionais (Translocases de aminofosfolípido, ESCRT-III e ARF6), promovem a brotação da membrana seguida de um processo de fissão na membrana plasmática em direção ao meio extracelular (etapa 3).

Fonte: Adaptado de Van Niel, 2018 (128).

2.4.2 Navegação, Interação e Fusão de MVs

Uma vez liberadas no meio externo, as MVs iniciam a via extracelular, que envolve a navegação, interação e fusão com as células-alvos. A navegação corresponde a um processo não regulado que implica em consequências importantes. Inicialmente, uma fração das vesículas permanece intacta por um curto período até que haja a ruptura da membrana, com liberação de cargas bioativas, a exemplo citocinas e fatores de crescimento, que ficam disponíveis para ligação direta aos seus receptores nas células adjacentes, sendo capazes de induzir respostas específicas (129,130).

A maioria das MVs, no entanto, é resistente à ruptura da membrana e persiste no meio extracelular, por um longo período. Suas enzimas de superfície e outras moléculas induzem uma forma de efeito de pré-ligação nas células circundantes (131). Além disso, as MVs tendem a se acumular nos espaços extracelulares proximais às junções intercelulares, movendo-se através e entre as células, podendo deixar seu fluido inicial e passar para áreas teciduais adjacentes, tais como outros fluidos, soro, linfa e líquido cefalorraquidiano (132–134).

A característica mais interessante da navegação das MVs é o reconhecimento de suas células-alvo específicas. Exemplos desse processo de reconhecimento foram observados há mais de 10 anos, quando as MVs derivadas de plaquetas no sangue mostraram ligação aos monócitos e não aos neutrófilos (135). Desde então, observações adicionais foram feitas a respeito, por exemplo, as MVs de células mesenquimais que se ligam a células mesenquimais, mas não a células-tronco mesenquimais, células endoteliais ou granulócitos (136). Tal característica também é observada nos EXOs (137).

Após o reconhecimento de suas células-alvo, as MVs estabelecem interações com suas superfícies, seguidas habitualmente pela fusão com a membrana plasmática ou membranas endocíticas (138). Tal interação, assemelha-se à interação do herpes-vírus com células hospedeiras, que são construídas em torno de uma glicoproteína central que atua como um "ativador" de sua ligação à superfície celular (139).

Contudo, estudos recentes sobre o processo de interação, demonstraram que as MVs podem se ligar de diferentes maneiras as células-alvo. Por exemplo, MVs liberadas da microglia interagem com outras células microgлияis a partir de rolamento sobre a superfície até atingir locais apropriados para a internalização, diferentemente da ligação aos astrócitos, onde as MVs microgлияis permanecem quase estacionárias (140).

Os mecanismos responsáveis por essas diferentes interações ainda precisam ser elucidados. De modo geral, as VEs não possuem um "ativador" como o observado para o herpes-vírus; em vez disso, as interações parecem ser geradas pela ligação bilateral de moléculas presentes na superfície das duas membranas que interagem (121). Nas MVs, esse papel foi proposto às tetraspaninas, integrinas, lectinas e proteoglicanos que se encontram em densidade variável na membrana. Nas células alvo, a ligação proposta pode envolver receptores de superfície e moléculas de adesão, bem como proteínas da matriz extracelular (MEC), a exemplo, laminina e fibronectina (138,141).

Uma vez ancoradas na membrana plasmática, as MVs podem induzir respostas funcionais ligando-se e ativando receptores específicos expressos nas células-alvo (142). Dependendo do tipo da células parental, as MVs podem iniciar vias de sinalização intracelular e apresentar antígenos, além disso, MVs derivadas de células cancerosas demonstraram promover o crescimento independente de ancoragem, uma das marcas da tumorigênese (Figura 8) (70,128,143).

Após a captação, as MVs também podem ser internalizadas por várias vias, que incluem: macropinocitose, fagocitose, endocitose mediada por caveola, endocitose mediada por catrina e através de jangada lipídica (141,144,145). A internalização terá como alvo a introdução das MVs exógenas na via endossômica canônica, por meio da qual alcançam o endossoma multivesicular (EMV), nos quais as MVs internalizadas poderão se misturar com vesículas intraluminais endógenas (VILs) (Figura 8) (128).

A fusão dos EMV com o lisossomo levará à degradação das MVs e à reciclagem de seu conteúdo para alimentar o metabolismo da célula receptora. As MVs ancoradas na membrana plasmática ou na membrana limitante do EMV podem liberar seu conteúdo intraluminal no citoplasma da célula receptora por fusão, um processo atualmente pouco conhecido, mas de grande importância para a entrega de cargas intraluminais, como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (Figura 8) (128,146,147).

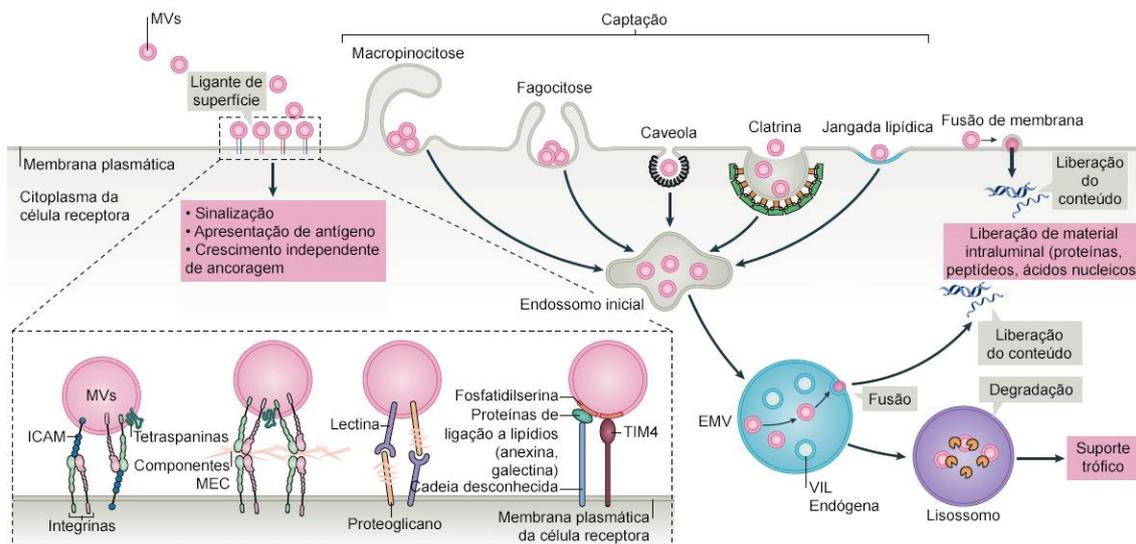


Figura 8. Interação e fusão de MVs com a célula-alvo. Após estabelecer interações com as proteínas de superfície da célula receptora, as MVs circulantes podem permanecer ligadas à superfície e desencadear sinalização intracelular, ou ser internalizadas por várias vias. A internalização terá como alvo a introdução das MVs exógenas na via endossômica canônica, por meio da qual alcançam o EMV. A fusão do EMV com o lisossomo levará à degradação das MVs e à reciclagem de seu conteúdo para alimentar o metabolismo da célula receptora. As MVs ancoradas na membrana plasmática ou na membrana limitante do EMV podem liberar seu conteúdo intraluminal no citoplasma da célula receptora através de fusão. Fonte: Adaptado de Van Niel, 2018 (128).

2.4.3 MVs derivadas de Células Leucêmicas

Embora a liberação de MVs ocorra em condições fisiológicas, durante processos patológicos como o câncer, a liberação dessas vesículas apresenta-se consideravelmente aumentada. Além disso, a quantidade de vesículas derivadas especificamente de células cancerosas demonstrou estar correlacionado com sua invasividade *in vitro* e *in vivo* (148,149).

As MVs no câncer foram documentadas pela primeira vez em 1978, quando foram identificadas em culturas de nódulos do baço e linfonodos de paciente com Linfoma de Hodgkin (150). Cerca de uma década depois, foi demonstrado que as MVs eram liberadas espontaneamente de células de melanoma altamente metastáticas (B16-F10) de camundongos, que quando fundidas com células de melanoma fracamente metastáticas (B16-F1), permitia a metástase de células F1 para os pulmões (151).

Ambos os estudos preparam o terreno para novas investigações sobre a importância da liberação dessas vesículas na progressão do câncer. Desde então, a transferência de carga mediada por MVs para células adjacentes ou distantes tem demonstrado afetar muitos estágios da progressão neoplásica, como angiogênese, evasão

imunológica e metástase (57,152). No entanto, o envolvimento das MVs na LLA tem sido pouco investigado e os dados sobre a caracterização e seus efeitos são limitados.

No contexto das leucemias de modo geral, as VEs, incluindo MVs e EXOs, derivados de células leucêmicas (VEs-CL) demonstraram modular seu microambiente para sustentar o crescimento e a progressão neoplásica, através da transferência de cargas bioativas, incluindo mRNAs, miRNAs e proteínas para as células circundantes, levando à inibição do sistema imunológico, aumento da angiogênese e agregação plaquetária. O estroma modificado pelas VEs-CLs também demonstrou influenciar no desenvolvimento e diferenciação das demais linhagens hematopoiéticas, além de promover a quimiorresistência, inibição de apoptose e quiescência, contribuindo coletivamente para expansão das CL (Figura 9) (53,54,153–158).

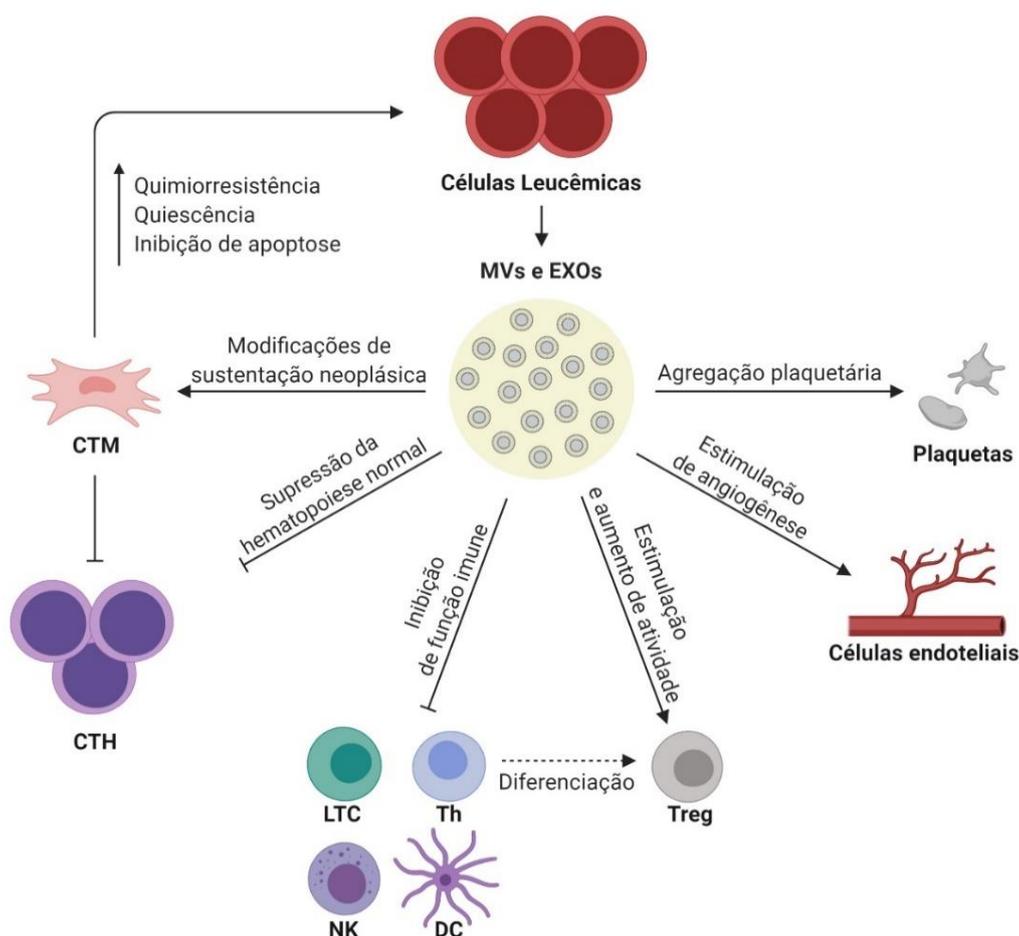


Figura 9. Influência de MVs e EXOs no microambiente leucêmico. As VEs-CLs modificam seu microambiente e promovem a inibição do sistema imunológico, aumento da angiogênese e agregação plaquetária. O estroma modificado na Leucemia promove a quimiorresistência, inibição de apoptose e a quiescência, além de influenciar no desenvolvimento e diferenciação de linhagens hematopoiéticas.

Fonte: Adaptado de Pando, 2018 (56).

2.4.4 MVs derivadas de Leucócitos inflamatórios

Os diferentes tipos celulares da imunidade inata e adaptativa, incluindo neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos são capazes de liberar MVs, que atuam no sistema imunológico como importantes mensageiros parácrinos (159,160). Os níveis de MVs derivadas de Leucócitos (MVs-L) são avaliados em fluidos biológicos por citometria de fluxo através de anticorpos específicos contra proteínas de superfície (161). Atualmente, diversos estudos buscam compreender como as MVs-L participam da regulação da resposta imunológica em condições fisiológicas e patológicas.

- ***Microvesículas derivadas de Neutrófilos:*** Os neutrófilos representam o tipo celular mais abundante envolvido na imunidade inata. Estudos demonstraram que a sua estimulação resulta na liberação de populações heterogêneas de MVs, que apresentam tanto a composição quanto as propriedades biológicas distintas, em conformidade com o tipo de estímulo pelo qual os neutrófilos produtores passam (162,163).

As MVs derivadas de neutrófilos (MVs-NEU) são elementos importantes em reações inflamatórias, uma vez, que estas contêm diversas proteínas pró-inflamatórias reconhecidas em sua superfície, além de possuírem a capacidade de se mover em resposta a um gradiente quimiotático (164). O principal efeito das MVs-NEU inclui interações com CEs, as quais sofrem várias alterações moleculares e bioquímicas (164–167).

As MVs-NEU também estão envolvidas na inflamação através de seu envolvimento na produção de citocinas pelas células NK (168). No entanto, sua função biológica não se limita ao seu papel como agentes pró-inflamatórios. Estudos demonstraram que as MVs-NEU induzem a secreção da citocina anti-inflamatória TGF- β em monócitos e células dendríticas (DCs) e diminuição da liberação dos mediadores pró-inflamatórias CXCL8, IL-6, TNF- α , IFN- γ (168–170). Elas também estimulam a fagocitose de neutrófilos em apoptose e a liberação de mediadores pró-resolutivos de macrófagos (162).

Além disso, a proteína anti-inflamatória anexina A1 presente nas MVs-NEU demonstrou induzir a diminuição da interação entre leucócitos e CEs, enquanto as MVs produzidas durante o processo de extravasamento de neutrófilos melhoraram a função da barreira endotelial (171,172). Por fim, as MVs-NEU podem ainda exibir uma função pró-trombótica através do encapsulamento do fator de ativação de plaquetas, combinado com a exposição da integrina Mac-1 e fator tissular ativados (173,174). Coletivamente, os

dados indicam que as MVs-NEU podem desempenhar papéis funcionais distintos, e antagonicos na resposta imunológica.

- ***Microvesículas derivadas de Monócitos/Macrófagos:*** As MVs liberadas a partir de monócitos (MVs-MON) ou macrófagos (MVs-MAC) podem exercer várias funções distintas. Primeiro, foi demonstrado que essas populações de MVs promovem a morte celular programada induzida por inflamação em células do músculo liso vascular através da transferência da caspase-1 piroptótica funcional (159,175).

Posteriormente, verificou-se que as MVs-MAC poderiam induzir a diferenciação de monócitos naive em macrófagos, através das cargas contendo altos níveis da molécula de miRNA-223, um importante regulador de proliferação e diferenciação de células mielóides (176). Além disso, essas vesículas demonstraram exibir MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras, semelhante as MVs derivadas de DCs, que podem desempenhar um papel na apresentação de antígenos (177,178).

O papel das MVs-MON na resposta inflamatória também foi observado em estudos que relataram que essas MVs regulam positivamente a secreção de mediadores inflamatórios, incluindo CCL2, CXCL8, e ICAM-1, por células epiteliais de vias aéreas e células epiteliais de pulmão humano (179,180). Em seguida, também foi relatado que a estimulação de podócitos por MVs-MON induz a produção de CCL2 e IL-6 (181).

Nesse contexto, também foi observado que as MVs-MON ativam a produção de IL-6 e TNF- α por monócitos e macrófagos, e consequentemente atuam como um sinalizador parácrino e autócrino (182). Outros efeitos imunomoduladores de MVs derivadas de monócitos e macrófagos incluem a regulação negativa de resposta imune, através da inibição da ativação do complemento e a indução da liberação de TGF- β (183).

- ***MVs derivados de células T:*** As MVs liberadas pelas células T (MVs-CT) podem ser direcionadas para diversos tipos celulares distintos, induzindo uma ampla variedade de efeitos imunorregulatórios, que vão de ativação imune à supressão imunológica (184). Embora as células T liberem as VEs (MVs e EXOs) constitutivamente, o acionamento do TCR e a estimulação intracelular de cálcio aumentam a liberação dessas vesículas (185).

Estudos relataram que as MVs-CT induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β), bem como anti-inflamatórias (antagonista do receptor da interleucina-1 secretora, sIL-1Ra) em monócitos (186). Enquanto que em mastócitos, as

MVs-CT demonstraram induzir a ativação e degranulação, com liberação das moléculas CXCL8, IL-24 e oncostatina M (187,188).

Além disso, há evidências substanciais de que as MVs-CT estão envolvidos na disfunção endotelial, onde estudos relataram que essas vesículas diminuem a produção de óxido nítrico (ON) ao passo que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em CEs (189,190). Por fim, estudos demonstraram que as MVs-CT são capazes de promover apoptose de células normais, bem como de células cancerosas (191–193).

Em termos de ações anti-inflamatórias, em função de transportarem ligantes regulatórios em sua superfície, as MVs-CT também são capazes de inibir atividade citotóxica de células NK, bloquear a estimulação de células T, e regular negativamente a capacidade estimulatória de células T à APCs, contribuindo assim para atenuar as respostas imunológicas (158,194–197).

2.4.5 MVs derivadas de Células Endoteliais

O endotélio corresponde a um conjunto de células endoteliais (CEs), que revestem os vasos sanguíneos e linfáticos, formando uma interface entre os tecidos e o sangue ou linfa. Tal localização estratégica confere seu papel fundamental no controle da vasorregulação, hemostasia e inflamação (198). Alterações na homeostasia vascular, decorrente de ativação ou apoptose, está associada à liberação de MVs derivadas de células endoteliais (MVs-CE), que representam uma importante fonte de MVs (161).

As MVs-CE são definidas com base na análise citométrica da expressão de glicoproteínas, incluindo a seletina E (CD62E), endoglina (CD105), molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1, CD31), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, CD106), caderina endotelial vascular (VE-caderina, CD144), e outras (198). Devido alguns desses marcadores também serem característicos de outros tipos de MVs, suas combinações são frequentemente utilizadas em estudos de MVs-CE (199–201).

Um crescente número de evidências indicam que as MVs-CE atuam como importantes agentes indutores de reações inflamatórias. Estudos relataram, que as CEs humanas liberam MVs após lesão ou estimulação por vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas TNF, IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , além de proteínas do complemento (C5b-9), proteínas C reativa (PCR) e lipopolissacarídeo (LPS) (202–204).

A estimulação de MVs-CE por mediadores inflamatórios, especialmente o TNF, também demonstrou induzir a expressão de um conjunto específico de proteínas de superfície (E-selectina, ICAM-1, PECAM-1 e $\alpha v\beta 3$), que promoveram a inflamação local e generalizada (205). Indicando um eixo TNF-MVs-CE, com ciclo inflamatório, onde o TNF promove a geração de MVs-CE, que por sua vez aumenta a expressão de moléculas de adesão em CEs, intensificando a interação entre CEs e leucócitos (205).

As MVs-CE também demonstraram envolvimento na modulação da imunidade adaptativa, através da indução da maturação de DCs plasmocitóides, importantes fontes de interferons do tipo I, interferons do tipo III, além de IL-6 e TNF- α (206–208). Tal estimulação, resultou no aumento da proliferação de células T CD4⁺ naive e secreção de citocinas Th1 (207). Além disso, as MVs-CE contribuem para a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ através da expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos e estimulação de células T, que incluem: CD40, MHC de classe I e II e ligante do coestimulador induzível de células T (ICOSL) (209).

2.4.6 MVs derivadas de Plaquetas

As plaquetas são pequenos elementos celulares anucleados derivados de megacariócitos que desempenham papel fundamental na coagulação sanguínea (210). As MVs derivadas de plaquetas (MVs-P) correspondem ao tipo de MVs mais pesquisado e representam a fração majoritária de MVs presentes na circulação (211,212). A imunofenotipagem por citometria de fluxo é comumente utilizada para determinar o número de MVs-P em fluidos biológicos usando anticorpos monoclonais contra glicoproteína IIb (CD41), glicoproteína IIIa (CD61) e P-selectina (CD62P) (213).

Dois tipos de observações apontam para um importante papel das MVs-P na inflamação. Primeiro, vários pesquisadores relataram que a carga de MVs-P pode interagir com células envolvidas em reações inflamatórias. Segundo, um aumento nos níveis de MVs-P no sangue foi relatado associado a distúrbios inflamatórios. Basicamente, a atividade pró-inflamatória de MVs-P se resume à modulação de vários processos, incluindo: ativação de células imunes e células endoteliais; intensificação da migração transendotelial de leucócitos e interação célula a célula; além da estimulação da quimiotaxia e redução da apoptose de células inflamatórias (214–220). Além disso, as MVs-P apresentam-se como uma fonte rica em citocinas pró-inflamatórias e componentes do complemento (221–223).

Por outro lado, estudos recentes documentaram que as MVs-P também podem atuar como fatores anti-inflamatórios (211,224). Todavia, ao contrário dos efeitos pró-inflamatórios bem estabelecidos, os mecanismos de supressão da inflamação são pouco compreendidos, e um número limitado de artigos aborda essa atividade. Além disso, deve ser enfatizado que as propriedades anti-inflamatórias das MVs-P são principalmente devidas à inibição da liberação de citocinas (225–227).

2.4.7 MVs derivadas de Eritrócitos

Se comparado às MVs-P, o número de estudos sobre o papel das MVs derivadas de eritrócitos (MVs-E) é limitado. No entanto, um crescente número de evidências indicam que as MVs-E também podem atuar como importantes mediadores de reações inflamatórias, e o fato dos eritrócitos constituírem o tipo de célula sanguínea mais abundante, o torna um importante objeto de investigação (228).

Quando os eritrócitos se deparam com estímulos específicos, como estresse de cisalhamento, ataque do complemento, estimulação agonista ou dano, a FS localizada quase exclusivamente na camada interna da membrana celular em condições normais, move-se para a membrana externa, indicando que a ancoragem da membrana no citoesqueleto intracelular é interrompida, promovendo a formação de MVs (229,230).

As MVs são geradas durante todo o ciclo de vida dos eritrócitos. É relatado que mais de 20% da hemoglobina (Hb) intracelular são perdidas através de vários mecanismos, incluindo a liberação de MVs (231). Sua remoção, por sua vez está usualmente relacionada a receptores específicos de FS expressos pelo sistema monócito-macrófago no fígado, pulmões e MO (232).

Estudos demonstraram que as MVs-E podem afetar vários processos, incluindo: coagulação, através de interações com fatores de coagulação e fatores anticoagulantes (229,233,234); inflamação, através de interações com células imunológicas e endoteliais, plaquetas e moléculas do complemento (231,235–237); e por fim, adesão celular, através da transferência de heme para CEs, e da eliminação e produção de óxido nítrico (NO) e outros radicais livres, intensificando a interação célula a célula (230,238,239).

2.4.8 MVs como biomarcadores Imunológicos

Em função da capacidade de conter um subconjunto de moléculas e antígenos específicos da célula parental, diversos estudos tem sugerido que as MVs podem desempenhar um papel como biomarcador, especialmente aquelas derivadas de células cancerosas, uma vez que estas contém informações genéticas exclusivas sobre o processo neoplásico, relacionadas ao estado de malignidade, tipo celular e suscetibilidade ao tratamento terapêutico (240). Além disso, a liberação de MVs é substancialmente maior durante a progressão do câncer, refletindo em altos níveis de MVs nos fluidos biológicos, tanto em neoplasias sólidas, como em neoplasias hematológicas (98,241).

Como tal, as MVs apresentam-se como potenciais biomarcadores para fins de diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de pacientes, além de alvos terapêuticos para elaboração de estratégias direcionadas as células cancerosas (56).

3. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

No cenário mundial, a LLA possui grande relevância por ser a neoplasia pediátrica de maior ocorrência. Considerando que há 50 anos a sobrevida na LLA pediátrica era 10-20% (242), atualmente as taxas de sobrevida geral de longo prazo são de 80-90% (243,244). Grande parte da melhora na taxa de sobrevida decorre da classificação dos pacientes em grupos de risco, que levam em consideração os fatores prognósticos e do subsequente ajuste da intensidade do tratamento (245).

No entanto, apesar do aumento na taxa de sobrevida, a morbidade consequente do tratamento encontra-se como um fator importante, por deixar sequelas em crianças com grande expectativa de vida. Logo, a identificação de biomarcadores altamente preditivos de desfechos clínicos desfavoráveis, tais como grupo de risco de tratamento e doença residual mínima, poderá auxiliar no estabelecimento de intervenções terapêuticas alternativas ou mais assertivas de maneira antecipada, diminuindo a duração da exposição a terapias ineficazes e potencialmente tóxicas, o que poderá proporcionar melhores resultados e maior qualidade de vida aos pacientes com LLA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Caracterizar o perfil de Microvesículas circulantes em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos a quimioterapia de remissão.

4.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil clínico-hematológico dos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B em terapia de indução da remissão;
- Avaliar o perfil de Microvesículas circulantes derivadas de leucócitos inflamatórios (linfócitos, monócitos e neutrófilos), eritrócitos, plaquetas, células endoteliais e células leucêmicas, em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B e em crianças saudáveis;
- Investigar a correlação entre as populações de Microvesículas circulantes nos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo do Perfil Imunológico em Crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda no Amazonas” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sob número de parecer 739.563/2014, CAAE 18309913.6.0000.0009 (Anexo III). Todos os pacientes e crianças que compuseram o grupo controle foram incluídas mediante aceitação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), para aquelas acima de 06 anos de idade, alfabetizadas.

5.2 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, do tipo longitudinal retrospectivo para caracterização das populações de MVs derivadas de células leucêmicas, leucócitos inflamatórios (linfócitos, neutrófilos e monócitos), células endoteliais, eritrócitos e plaquetas em pacientes pediátricos com LLA-B *de novo*, tratadas na Fundação HEMOAM, localizado na cidade de Manaus, AM.

5.3 População de estudo

A população do estudo foi composta por pacientes atendidos no serviço de hematologia pediátrica na Fundação HEMOAM, com diagnóstico de LLA-B e obtida por demanda espontânea no período de março de 2014 a março de 2018. Além dos pacientes, foram recrutadas crianças (sem leucemia) atendidas na triagem clínica da Fundação HEMOAM, que realizaram o hemograma para investigação de anemia, cujo resultado não apresentou alterações na série leucocitária.

5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão utilizados para o grupo caso, foram: pacientes com LLA-B comum *de novo*, admitidos no Serviço de Hematologia Pediátrica da Fundação HEMOAM, com idade inferior a 18 anos, tratados com o Protocolo GBTLI LLA-2009. Para o grupo controle foram definidos como critérios de inclusão: idade inferior a 18 anos, sem alterações no hemograma e sem infecção prévia há menos de 04 semanas. Como

critérios de exclusão, para ambos os grupos, foram utilizados os seguintes parâmetros: material biológico insuficiente, coagulado, mal conservado ou com contaminação e crianças com doença inflamatória aguda ou crônica conhecida, ou distúrbio autoimune.

5.5 Obtenção das amostras

Para realização do estudo, foram utilizadas amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) de pacientes com LLA-B (amostras independentes), as quais foram obtidas através de punção aspirativa da crista ilíaca e através de punção venosa, respectivamente (procedimentos de rotina para estes pacientes). As coletas ocorreram em três momentos da terapia de indução da remissão, referidos como: dia do diagnóstico (D0), dia 15 (D15) e ao final da terapia de indução da remissão (D35), sendo coletados 2 ml de MO e 3ml de SP em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA pela Equipe Médica da Fundação HEMOAM. Além das amostras dos pacientes, foram obtidas amostras de SP de crianças sem leucemia, obtidas através de punção venosa, para serem utilizadas como valor de referência comparativo nas análises.

As amostras foram identificadas com o código do projeto maior e encaminhadas ao Laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM, onde foram centrifugadas a 900 ×g por 15 min. Posteriormente o sobrenadante / Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foram coletados e transferidos para criotubos e armazenados no biorrespositório do laboratório multidisciplinar de pesquisa, em freezer -80°C (Figura 10).

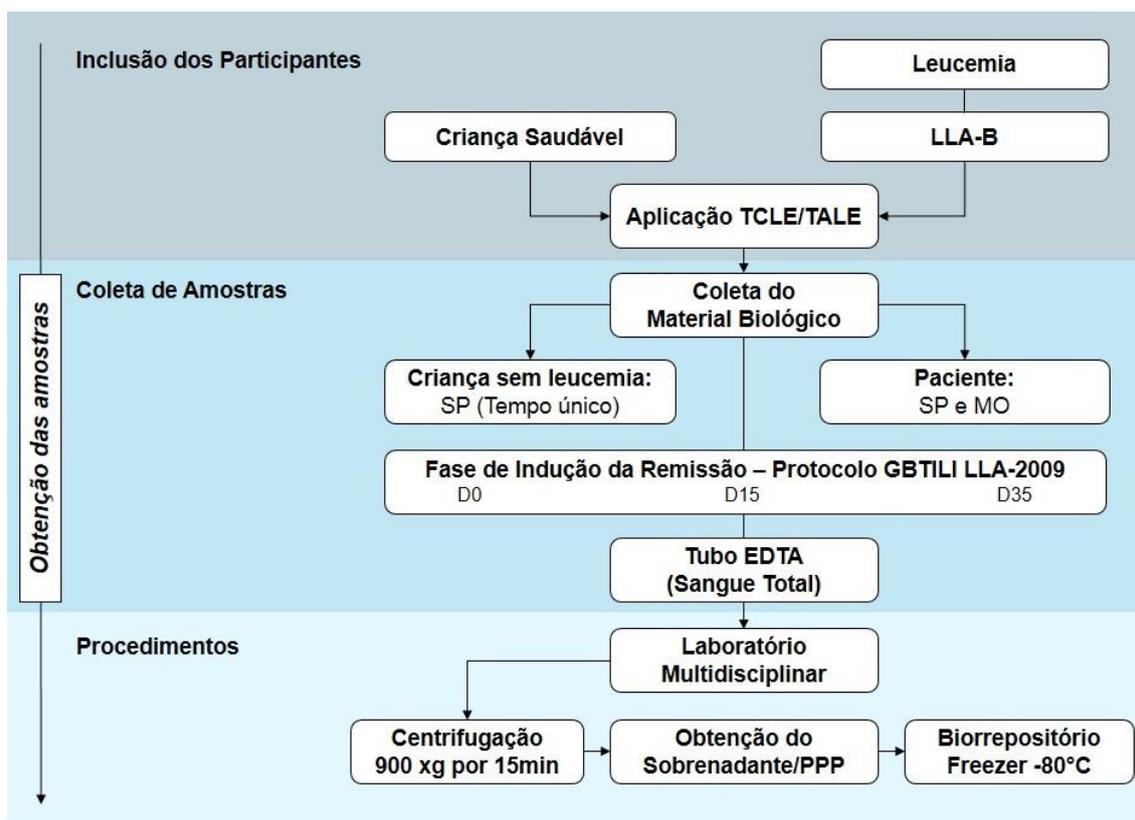


Figura 10. Fluxograma de obtenção das amostras. Demonstração detalhada das etapas de obtenção e processamento das amostras utilizadas no estudo.

5.6 Seleção das amostras

A partir das amostras armazenadas no biorrepositório, foram selecionadas amostras de MO (D0, D15 e D35) de 10 pacientes; amostras de SP (D0, D15 e D35) de 10 pacientes; e amostras de SP (Tempo único) de 10 crianças sem leucemia para compor o grupo de controle negativo (Figura 11). As amostras selecionadas, foram utilizadas para a caracterização de MVs, realizada no Instituto Rene Rachou (IRR) - Fiocruz Minas, seguindo o Protocolo de Imunofenotipagem de MVs (246) (Anexo IV) do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) coordenado pelo Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dra. Andréa Teixeira Carvalho.

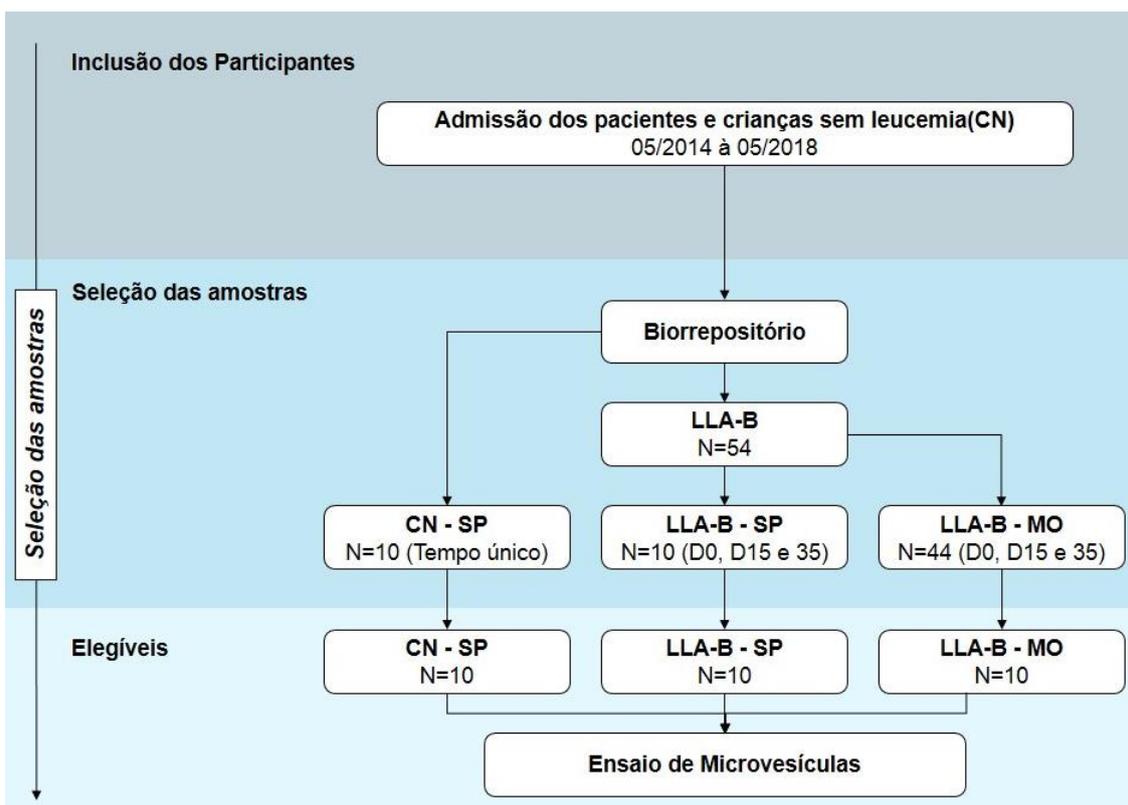


Figura 11. Fluxograma de seleção das amostras. Demonstração detalhada da seleção das amostras utilizadas no estudo.

5.7 Imunofenotipagem de Microvesículas

Inicialmente, as amostras de sobrenadante / PPP derivadas de MO e SP foram descongeladas em banho-maria a 36°C, e aliqüotadas em tubos tipo eppendorfs que foram centrifugados a 13000 ×g por 5 minutos em Temperatura Ambiente (TA) para obtenção do Plasma Livre de Plaquetas (PLP).

Posteriormente as amostras foram tratadas com tampão citrato-heparina, e novamente centrifugadas a 15000 ×g por 90 min a 15°C, o sobrenadante foi retirado, e então os *pellets* foram ressuspensos em 100 µl de tampão anexina, e distribuídos nos poços (placa) contendo os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligam aos marcadores de superfície específicos presentes nas populações de MVs (Tabela 4), e foram incubados por 30 minutos ao abrigo de luz em TA. Após a incubação, foi aplicado 300 µl de tampão de ligação de anexina nos poços, e então os conteúdos foram transferidos para os microtubos de citometria de fluxo.

Tabela 4. Painel para imunofenotipagem das populações de MVs.

Tubo	MVs	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC
1	Controle (Anexina V)	Anex V	-	-	-	-
2	Neutrófilos	Anex V	CD66b	-	-	CD45
3	Cel. Endoteliais / Eritrócitos	Anex V	CD51/CD61	-	CD235a	-
4	Células T / Plaquetas	Anex V	CD3	CD41a	-	-
5	Monócitos	Anex V	CD16	CD14	-	-
6	Cel. Leucêmicas	Anex V	CD10	CD34	CD19	CD45

A aquisição das amostras foi realizada no citometro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter), equipamento altamente sensível que permite a detecção e caracterização de MVs numa escala de 100-900nm através da utilização de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix. Estas microesferas possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) e são utilizadas como referência para caracterização de MVs (Figura 12).

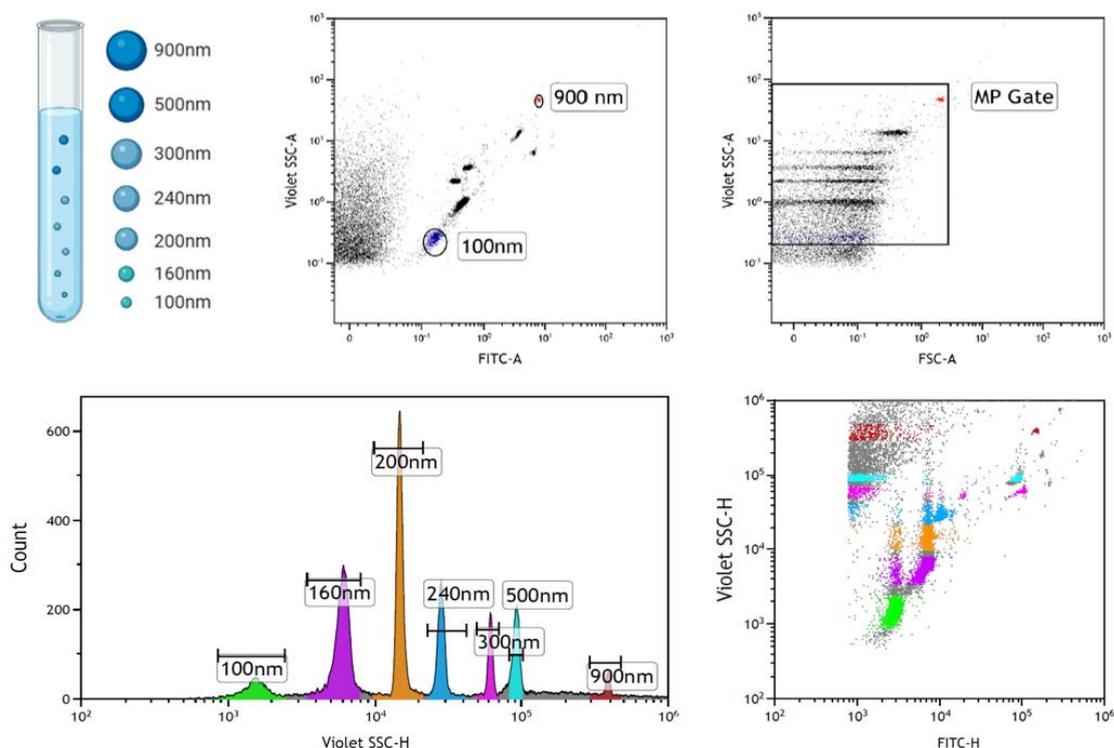


Figura 12. Estratégia para imunofenotipagem de MVs por citometria de fluxo. Através da utilização das Gigamix (microesferas de 100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm), será definido uma região, nomeada MP Gate. Os seguintes histogramas e dotplots serão adicionados na região MP Gate, e partir desta região serão analisadas as MVs do estudo.

5.8 Obtenção dos dados sociodemográficos e clínicos-hematológicos

A coleta dos dados sociodemográficos (idade, gênero) e clínico-hematológicos (grupo de risco, doença residual mínima, imunofenótipo, mielograma, hemograma) foi realizada a partir dos registros do laboratório de marcadores celulares e prontuários do Setor de Atendimento Médico e Estatístico (SAME), posteriormente foram plotados em planilha eletrônica no Microsoft Excel, onde foi construído o banco de dados do estudo.

5.9 Análise dos dados

Os dados sociodemográficos e hematológicos dos pacientes foram apresentados em formas de tabelas, elaboradas com o programa Microsoft Excel. Os resultados obtidos na imunofenotipagem foram analisados através do software FlowJo (v.10). Para elaboração das análises estatísticas convencionais foi utilizado o software GraphPad Prism (v.8.0.1). Para verificar a normalidade de dados foi realizado o teste Shapiro Wilk para cada variável, mostrando uma distribuição não paramétrica. A comparação dos valores entre dois grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney, enquanto que para a comparação das variáveis com três ou mais grupos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para as comparações múltiplas entre grupos. Os níveis de significância estatística definidos em ambos os casos foi de $p < 0,05$. Além disso, foi realizado análise de redes biológicas para demonstração das interações complexas entre as populações de MVs avaliadas no estudo, com base na associação das mesmas, utilizando o software Cytoscape (v.3.0.3). As correlações positivas e negativas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O índice de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação como fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($r \geq 0,36$ a $r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$).

6. RESULTADOS

6.1 Características da população de estudo

A população do estudo consistiu de 10 crianças sem leucemia (GC), e 20 crianças com LLA-B, sendo utilizado 10 amostras de SP (LLA-B SP) e 10 amostras de MO (LLA-B MO) (amostras de pacientes distintos). Os pacientes com LLA-B apresentaram idade mediana de 3 (IQR 2-9) e 5 (IQR 3-6) anos, para os grupos LLA-B SP e LLA-B MO, respectivamente, enquanto a mediana de idade do GC foi de 9 (IQR 6-13) anos. O sexo masculino foi predominante nos pacientes com LLA-B, com 7/10 e 8/10 para os grupos LLA-B SP e LLA-B MO, respectivamente, enquanto que o GC foi composto por 5 crianças do sexo masculino e 5 do sexo feminino, conforme observado na Tabela 5.

Os dados hematológicos de cada grupo, juntamente com as medianas e os resultados da análise estatística também estão descritos na Tabela 5. Pacientes com LLA-B (LLA-SP e LLA-B MO) apresentaram uma diminuição significativa de neutrófilos, monócitos, hemoglobina e plaquetas em comparação ao GC, refletindo a usual tríade da leucemia, caracterizada por anemia, neutropenia e trombocitopenia (1). Além disso, o grupo LLA-B MO apresentou um aumento significativo no número de leucócitos totais quando comparado aos grupos LLA-B SP e GC, juntamente com aumento significativo de linfoblastos em comparação ao grupo LLA-B SP.

Tabela 5. Características sociodemográficas e hematológicas da população de estudo.

Características	GC (n = 10)	LLA-B SP (n = 10)	LLA-B MO (n = 10)	p-value
Idade (anos), mediana (IQR)	9 (6-13)	3 (2-9)	5 (3-6)	
Sexo, (masculino/feminino)	5M/5F	7M/3F	8M/2F	
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	7.540 (6.788-8.178)	9.135 (4593-12195)	56.735 (41.865-76.825)	0,0003^{b,c}
Linfoblastos ABS [%], mediana (IQR)		7.239 [62%] (995- 8.278)	47964 [82%] (28.483-64.920)	0,0048^c
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	3.24 (2.89- 3.55)	0.43 (0.18-0.98)	0.30 (0.21-0.64)	<0,0001^{a,b}
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	3.18 (2.50- 3.73)	3.10 (2.25- 4.29)	3.19 (3.13-4.61)	0,8423
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	0.40 (0.29-0.54)	0.11 (0.00-0.21)	0.13 (0.05-0.27)	0,0013^{a,b}
Hemoglobina (g/dL), mediana (IQR)	13.4 (12.3-13.7)	8.3 (3.7-9.7)	7.1 (4.6-8.1)	0,0008^{a,b}
Plaqueta ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	325 (302-434)	54 (28-101)	53 (24-89)	<0,0001^{a,b}

Abreviações: GC, grupo controle; SP, sangue periférico; MO, medula óssea; IQR, intervalo interquartil

Valores de referência: Leucócitos: $5.2 - 12.4 \times 10^3/\mu\text{L}$; Neutrófilos: $1.9 - 8 \times 10^3/\mu\text{L}$; Linfócitos: $0.9 - 5.2 \times 10^3/\mu\text{L}$; Monócitos: $0.16 - 1 \times 10^3/\mu\text{L}$; Hemoglobina: $12 - 18 \text{ g/dL}$; Plaqueta: $130 - 140 \times 10^3/\mu\text{L}$.

^aDiferença significativa de GC para LLA-B SP; ^bDiferença significativa de GC para LLA-B MO;

^cDiferença significativa de LLA-B SP para LLA-B MO; Fonte em negrito indica significância estatística.

6.2 Perfil de MVs circulantes em pacientes com LLA-B ao diagnóstico

A caracterização do perfil de MVs circulantes demonstrou que pacientes com LLA-B (LLA-B SP e LLA-B MO) ao diagnóstico apresentaram uma diminuição significativa na contagem de MVs derivadas de linfócitos T (CD3) e plaquetas (CD41a) em comparação ao GC. Por outro lado, o grupo LLA-B SP apresentou um aumento significativo de MVs derivadas de células endoteliais (CD51/61) quando comparado ao grupo LLA-MO e GC. Notavelmente foi observado um aumento significativo de MVs derivadas de linfoblastos expressando o CD10, no SP e MO dos pacientes com LLA-B (LLA-B SP e LLA-B MO, respectivamente) (Figura 13).

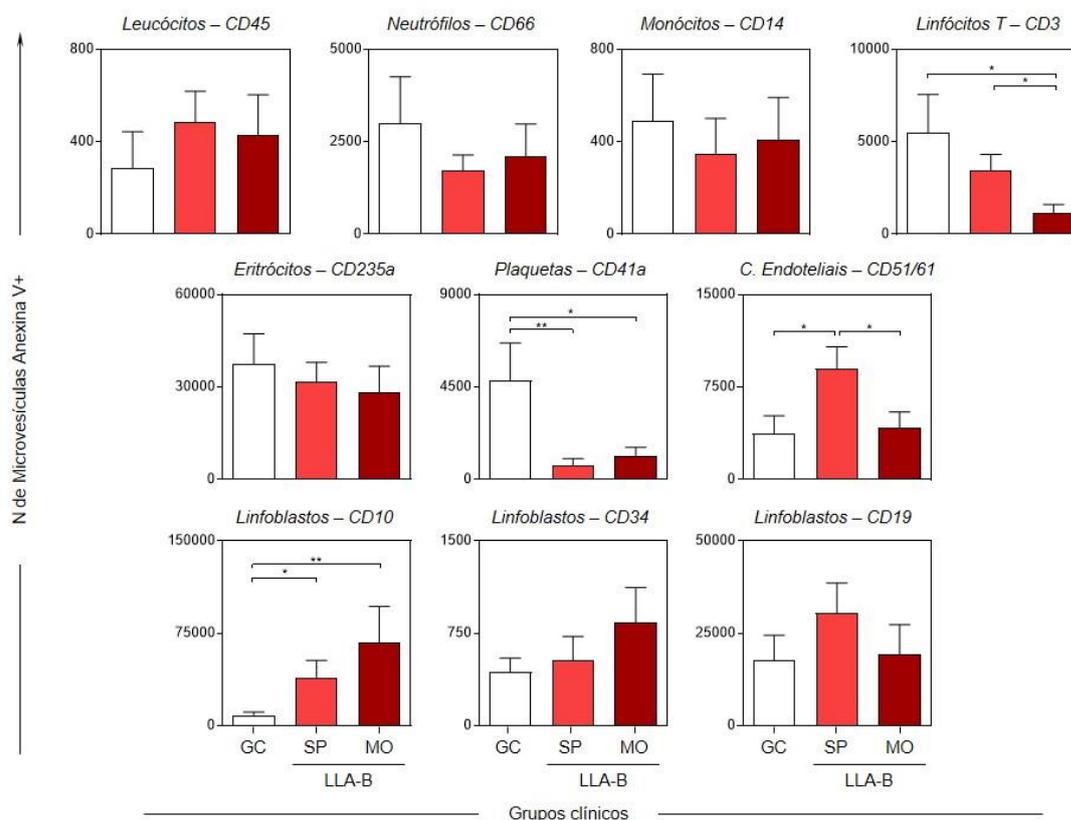


Figura 13. Contagem de MVs circulantes no sangue periférico e medula óssea dos pacientes com LLA-B. Comparação entre os níveis de MVs derivadas de Leucócitos – CD45; Neutrófilos – CD66; Monócitos – CD14; Linfócitos T – CD3; Eritrócitos – CD235a; Plaquetas – CD41a; Células endoteliais – CD51/61; e Linfoblastos – CD10/CD34/CD19, nos grupos LLA-B SP (■), LLA-B MO (■) e GC (□). As análises

estatísticas foram realizadas usando *Student's t test* ou *Mann Whitney test*. Diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,05$ (*).

6.3 Cinética de MVs circulantes durante a terapia de indução da remissão

A análise da cinética de MVs circulantes no SP e MO foi realizada ao D0, D15 e D35 para avaliar a contagem de MVs no início e ao final da terapia de indução (Figura 14). Os resultados demonstraram uma diminuição significativa de MVs derivadas de neutrófilos (CD66), linfócitos T (CD3), eritrócitos (CD235a) e células endoteliais (CD51/61) no SP ao D15. Também foi observado uma clara diminuição de MVs derivadas de linfoblastos (CD10 e CD19) ao D35. Um comportamento semelhante foi observado na MO, onde houve a diminuição significativa de CD10 ao D35, no entanto o CD19 apresentou um perfil distinto, com diminuição no D15 e aumento ao D35. Além disso, foi observado um aumento significativo de MVs derivadas de plaquetas ao D35 no SP e MO dos pacientes com LLA-B.

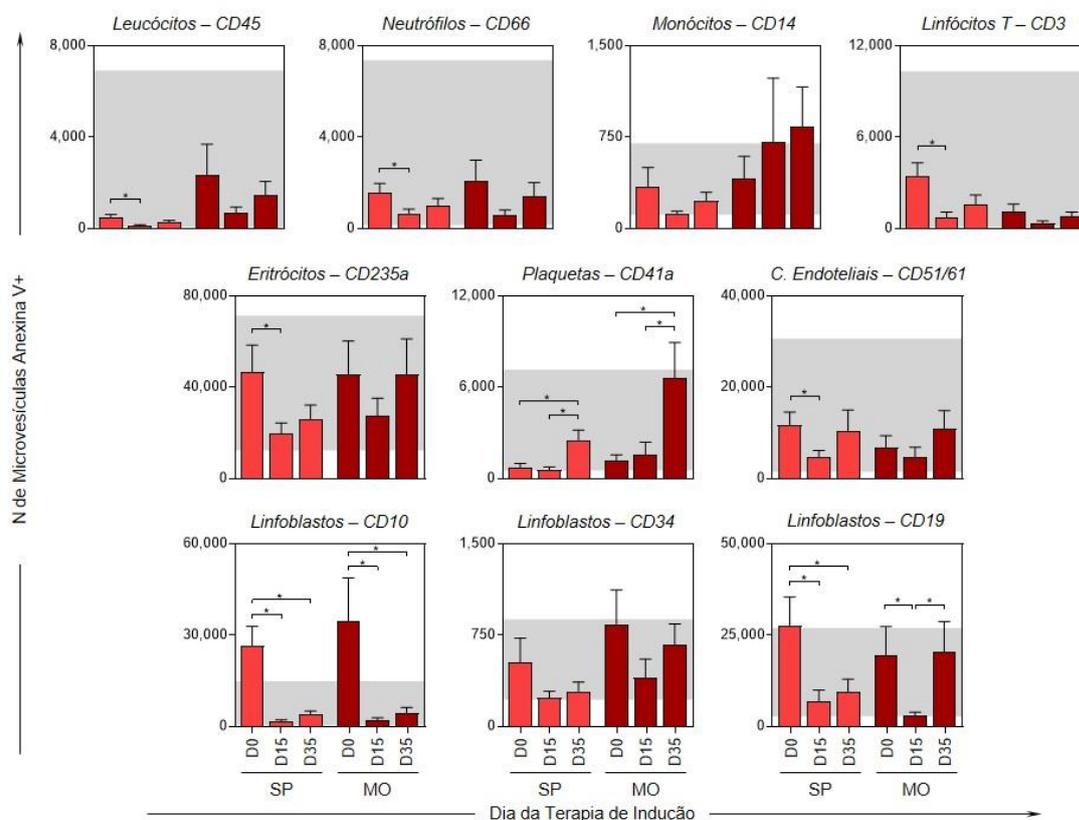


Figura 14. Cinética de MVs circulantes nos pacientes com LLA-B durante a terapia de indução da remissão. Acompanhamento da contagem de MVs circulantes ao diagnóstico (D0), ao dia 15 (D15) e ao final da terapia de indução da remissão (D35) nos grupos LLA-B SP (■) e LLA-B MO (■). Os intervalos

interquartil (25^o-75^o) dos resultados observados no GC foram utilizados como intervalo de referência (fundo cinza - ). As análises estatísticas foram realizadas usando *Student's t test* ou *Mann Whitney test*. Diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,05$ (*).

6.4 Rede biológica de MVs circulantes durante a terapia de indução da remissão

A construção de redes biológicas integrativas foi realizada para avaliar a interação entre as populações de MVs circulantes durante a terapia de indução da remissão (Figura 15). Os resultados demonstraram que os pacientes com LLA-B (LLA-B SP e LLA-B MO) exibem ao D0 uma rede com um número restrito de interações. Ao D15, é observado um discreto aumento no número de conexões de vizinhança. Já no D35, é observado um aumento expressivo no número de interações entre as populações de MVs circulantes nos pacientes com LLA-B, que exibem um perfil mais semelhante ao GC, porém com maior número de interações. Digno de nota, o SP (LLA-B SP) tende a refletir o perfil da MO (LLA-B MO) durante a terapia de indução, porém com um número menor de interações, que pode ser explicado pela maior complexidade do microambiente medular.

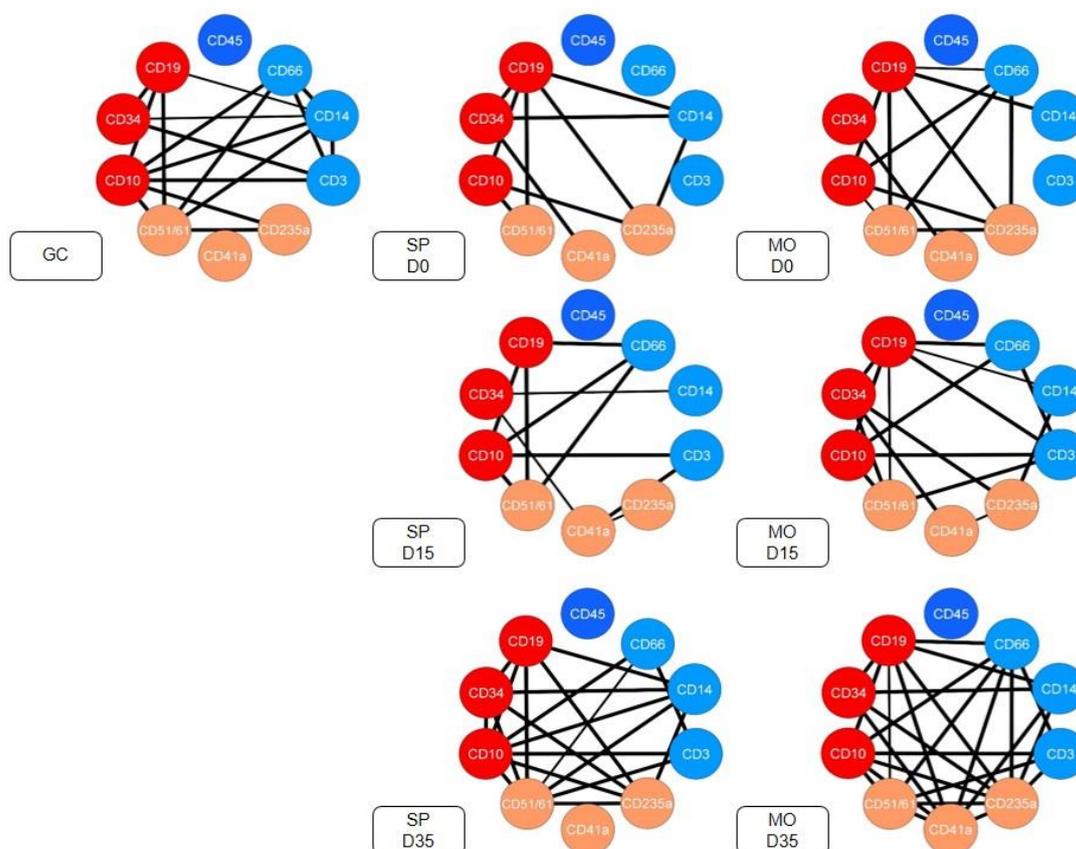


Figura 15. Rede de MVs circulantes nos pacientes com LLA-B durante a terapia de indução da remissão. Redes biológicas de MVs derivadas de Leucócitos – CD45; Neutrófilos – CD66; Monócitos – CD14;

Linfócitos T – CD3; Eritrócitos – CD235a; Plaquetas – CD41a; Células endoteliais – CD51/61; e Linfoblastos – CD10/CD34/CD19, foram montadas para identificar a correlação entre as populações de MVs no sangue periférico e no microambiente da medula óssea dos pacientes com LLA-B durante os três momentos da terapia de indução (D0, D15 e D35) e em momento único no GC (sangue periférico). Os nós coloridos são usados para identificar as populações de MVs derivadas de neutrófilos, monócitos e linfócitos (●); eritrócitos, plaquetas e células endoteliais (●); e de marcadores associados a linfoblastos (●). As correlações de Spearman significativas em $p < 0,05$ são representadas por linhas contínuas que indicam uma correlação positiva forte ($r \geq 0,68$ = linha contínua espessa) e moderada ($0,36 \geq r \leq 0,68$ = linha contínua mais fina) conforme proposto por Taylor (18).

7. DISCUSSÃO

Evidências crescentes demonstraram que o microambiente desempenha um papel crucial na sobrevivência das CLs e que a comunicação entre as CLs e células circundantes pode ser mediada por várias moléculas imunológicas solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (3,247,248). Semelhante a essas moléculas, avanços recentes na biologia do câncer revelaram que as MVs são liberadas em grande quantidade pelas CLs, e atuam como mediadores-chave na comunicação celular, através da transferência de cargas bioativas capazes de reprogramar as células estromais e células imunológicas, modulando um microambiente favorável a sobrevivência e progressão leucêmica (56).

À luz dessas evidências, analisamos o perfil de MVs derivadas de linfoblastos/CLs (MVs-CL) na circulação e localizadas no compartimento medular de pacientes com LLA-B. De interesse, em nosso estudo, também avaliamos os níveis de MVs derivadas neutrófilos (MVs-NEU), monócitos (MVs-MON), linfócitos T (MVs-LT), eritrócitos (MVs-E), plaquetas (MVs-P) e células endoteliais (MVs-CE). Detectamos uma diminuição nos níveis de MVs-P no SP e MO dos pacientes com LLA-B em comparação ao GC, refletindo a plaquetopenia intensa observada no hemograma (Tabela 5). Em contrapartida, identificamos níveis elevados de MVs-CE (LLA-B SP), indicando uma maior ativação dessas células na leucemia, resultando em maior produção de MVs.

Com relação as MVs-CL, foi observado um aumento significativo de MVs com fenótipo CD10⁺ no SP e MO dos pacientes com LLA-B (Figura 13). O CD10, também conhecido como Antígeno Comum de Leucemia Linfoblástica Aguda (CALLA) é uma proteína de membrana integral de superfície celular tipo II da família M13, que é expressa especificamente nos estágios iniciais do progenitor linfoide, auxiliando na identificação

dos estágios no desenvolvimento de células B (249). O CD10 é amplamente utilizado para distinguir a maioria dos casos de LLA de outras neoplasias hematológicas, sendo comumente utilizado no diagnóstico por citometria de fluxo e monitoramento de malignidades hematológicas de origem de células B, na categorização de estágio maduro e blástico, além de detecção de doença residual mínima (250,251).

Identificado originalmente em CLs da LLA, foi posteriormente detectado em uma variedade de células, incluindo da próstata, rim, intestino, endométrio e pulmão (252,253). Sua presença em outras células sugere um papel variado não restrito especificamente a malignidades hematológicas (254). Biologicamente sua principal função é metabolizar polipeptídeos através da clivagem de peptídeos entre resíduos hidrofóbicos, levando a inativação de uma variedade de neuropeptídeos fisiologicamente ativos. No contexto do câncer, a atividade e alta expressão de CD10 foi correlacionada a um pior prognóstico e diminuição da sobrevida em uma variedade de malignidades, através de mecanismos que incluem resistência terapêutica a drogas e radiação, aumento do grau do tumor, e fenótipo mais agressivo (invasão e metástase) (254–260).

Na ontogenia das células B, o CD10, presente nas células pré-B, é transitoriamente expresso durante os diferentes estágios de maturação e desaparece nos linfócitos B maduros. Nesse sentido, através da avaliação da cinética durante a terapia de indução foi possível observar um claro declínio nos níveis de MVs-CL CD10⁺ ao D35 (Figura 14). De maneira similar, foi observado um declínio de MVs-CL CD19⁺ no SP, enquanto na MO foi observado uma diminuição no D15 com aumento no D35. Coletivamente esses achados podem ser indicativos da eliminação/diminuição das CLs ao D35, com subsequente produção de linfócitos B maduros e MVs (MVs-LB) CD19⁺ no compartimento medular. Em adição, ao D35 também foi observado o aumento nos níveis de MVs-P no SP e MO, indicando uma recuperação na produção de plaquetas.

A análise da rede integrativa de MVs também demonstrou alterações importantes durante a terapia de indução. No D0, os pacientes com LLA-B exibiram uma rede de MVs caracterizadas por um número limitado de interações (Figura 15). Enquanto no D35, os pacientes com LLA-B exibiram uma rede caracterizada pela recuperação das interações entre as populações de MVs, com destaque para as MVs derivadas de Leucócitos inflamatórios (linfócitos, monócitos e neutrófilos). Um comportamento semelhante foi observado em rede integrativa de quimiocinas e citocinas (Anexo V) (Dados não publicados - Em revisão por pares), onde ao D35 os pacientes com LLA-B exibiram uma

rede rica em interações, caracterizada pela recuperação resposta pró-inflamatória, indicativo da modulação de um microambiente imunossuprimido ao D0, favorável a progressão leucêmica. Digno de nota, o SP (LLA-B SP) tende a refletir o perfil da MO (LLA-B MO) durante a terapia de indução, porém com um número menor de interações, que pode ser explicado pela maior complexidade do microambiente medular.

8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Além do impacto gerado pela pandemia, a principal limitação do estudo foi amostras com volume insuficiente para os ensaios de MVs, responsável pela diminuição expressiva do N amostral do estudo, o que acabou comprometendo as análises de associação com o grupo de risco de tratamento, presença de doença residual mínima e quantitativo de blastos. No entanto, temos como próximo objetivo realizar um estudo mais abrangente onde utilizaremos amostras de SP e MO do mesmo paciente, um N amostral mais elevado, e incluiremos novas populações de MVs, bem como outros biomarcadores potenciais de prognóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo indica que: (i) pacientes com LLA-B apresentaram uma produção acentuada de MVs-CE quando comparado ao GC; (ii) em nossa coorte, CD10 e CD19 foram os marcadores mais expressos nas MVs-CL; os níveis de MVs-CL podem refletir o quantitativo de blasto, estando possivelmente associado a desfechos desfavoráveis; (iv) pacientes com LLA-B apresentaram perfis e redes biológicas de MVs distintos ao D0 e D35 da terapia de indução. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve os percentuais e a cinética de MVs circulantes derivadas de leucócitos inflamatórios e CLs em pacientes com LLA-B.

10. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Em paralelo com o desenvolvimento do presente estudo, foram realizadas outras atividades e colaborações em projetos do grupo de pesquisa, obtendo como produto:

- A publicação de 2 artigos Originais nas revistas *Plos One* e *Scientific Reports* (Anexo VI e Anexo VII, respectivamente);

- A publicação de 1 artigo de Revisão na revista *Journal of Immunology Research* (Anexo VIII);
- A submissão de 2 artigos originais nas revistas *Journal of Oncology* e *Frontiers in Oncology* (Anexo IX e X, respectivamente).

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*. 2017;7(6):e577.
2. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020 May 28;20(5):285–98. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41568-020-0245-2>
3. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016;1863(3):449–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>
4. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* [Internet]. 2009 Dec 3;23(12):2233–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu2009175>
5. Bakker E, Qattan M, Mutti L, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016 Mar;1863(3):414–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915002657>
6. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Mar;164(6):767–78. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.12725>
7. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, Skinner AM, Goloviznina NA, Roberts CT, et al. RNA Trafficking by Acute Myelogenous Leukemia Exosomes. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Jan 15;73(2):918–29. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-2184>
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov;68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
9. The International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory [Internet]. 2018. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
10. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. 2017;1(128).
11. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil. 2019;120.

12. INCA. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade. Coord Prevenção e Vigilância [Internet]. 2016; Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//incidencia-mortalidade-morbidade-hospitalar-por-cancer.pdf>
13. Vieira AF, Neves B TS. Perfil Epidemiológico da Leucemia Linfóide nas Regiões do Brasil. UNILUS Ensino e Pesqui. 2017;14:130–43.
14. Vieira AF, Neves B TS, Balmant NV, de Souza Reis R, de Oliveira Santos M, Pinto Oliveira J, de Camargo B. Trends in Cancer Mortality Among Adolescents and Young Adults in Brazil. *J Adolesc Young Adult Oncol* [Internet]. 2017 Jun;6(2):130–43. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jayao.2016.0042>
15. de Camargo B, de Oliveira Santos M, Rebelo MS, de Souza Reis R, Ferman S, Noronha CP, et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Feb 1;126(3):715–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24799>
16. Reis R de S, Santos M de O, de Camargo B, Oliveira JFP, Thuler LCS, Pombo-de-Oliveira MS. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2016 Feb 17;33(2):83–93. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08880018.2015.1130763>
17. de Souza Reis R, de Camargo B, de Oliveira Santos M, de Oliveira JM, Azevedo Silva F, Pombo-de-Oliveira MS. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2011 Jan;56(1):58–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.22736>
18. Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. Jabbour E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Aug 22;14(8):e0221518. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0221518>
19. National Cancer Institute. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 3]. Available from: https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#link/_7_toc
20. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2003;102–31.
21. Souza R De, Paula N De, Oliveira M De, Fernando J, Oliveira P, Claudio L, et al. Mother and child characteristics at birth and early age leukemia : a case-cohort population-based study in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2017;516:1–8.
22. Reis RDS, Camargo B De, Santos MDO, Moreira J, Oliveira D, Silva FA, et al. Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:58–64.
23. Chang JS, Zhou M, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(8):1736–

- 40.
24. Okuda T, Shurtleff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, et al. Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 1995 May 1;85(9):2321–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727766>
 25. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2004 Apr;40(2):91–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 26. Ching-Hon Pui. Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research. 2003. 43-58 p.
 27. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2009 Aug;23(4):655–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858809000859>
 28. Pui C-H, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* [Internet]. 2012 Aug 9;120(6):1165–74. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/6/1165/30512/Pediatric-acute-lymphoblastic-leukemia-where-are>
 29. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2012 Feb;29(1):2–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740257011000980>
 30. Bain BJ, Estcourt L. FAB Classification of Leukemia. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier Inc.; 2013. p. 5–7.
 31. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–406.
 32. A. Victor Hoffbrand PAHM. *Essential Haematology*. Wiley-Blackwell. 2013;6:468.
 33. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 May 19;127(20):2391–405. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revision-to-the-World-Health-Organization>
 34. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U, et al. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *J Natl Compr Cancer Netw* [Internet]. 2015 Oct;13(10):1240–79. Available from: <https://jncn.org/doi/10.6004/jncn.2015.0153>
 35. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Oct 15;373(16):1541–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1400972>
 36. de Queiroz Mendonca C, Freire MV, Viana SS, Silva Tavares MKG, Almeida Silva WM, Cipolotti R. Ocular manifestations in acute lymphoblastic leukemia: A

- five-year cohort study of pediatric patients. *Leuk Res* [Internet]. 2019 Jan;76:24–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212618304867>
37. Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. *Leukemia* [Internet]. 1993 Aug;7 Suppl 2:S142–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8361220>
 38. Salina TD da C, Ferreira YA, Alves EB, Ferreira CM, De Paula EV, Mira MT, et al. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Nov 16;6(1):31179. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep31179>
 39. BRANDALISE, SR; PINHEIRO, VR; LEE M. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA-2009. *ALL Brazilian Group Leuk*. 2009;121–350.
 40. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Vol. 120, Blood*. 2012. p. 1165–74.
 41. Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *Korean J Hematol* [Internet]. 2012;47(4):245. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIX.php?id=10.5045/kjh.2012.47.4.245>
 42. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* [Internet]. 2008 Feb;132(4):598–611. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408001396>
 43. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* [Internet]. 2011 Nov;147(5):1146–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411012694>
 44. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* [Internet]. 2014 Jan 15;505(7483):327–34. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature12984>
 45. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med* [Internet]. 2014 Aug 6;20(8):833–46. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.3647>
 46. Perry JM, Li L. Disrupting the Stem Cell Niche: Good Seeds in Bad Soil. *Cell* [Internet]. 2007 Jun;129(6):1045–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407007283>
 47. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* [Internet]. 2003 Oct;425(6960):841–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature02040>
 48. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in

- the Bone Marrow Niche. *Cell* [Internet]. 2004 Jul;118(2):149–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404006622>
49. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* [Internet]. 2003 Oct;425(6960):836–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature02041>
 50. Kopp H-G, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. *Physiology* [Internet]. 2005 Oct;20(5):349–56. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00025.2005>
 51. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells. *Science* (80-) [Internet]. 2008 Dec 19;322(5909):1861–5. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1164390>
 52. Bouvy C, Wannez A, Laloy J, Chatelain C, Dogné J-M. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo. *Leuk Res* [Internet]. 2017 Nov;62:70–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212617305222>
 53. Farahani M, Rubbi C, Liu L, Slupsky JR, Kalakonda N. CLL Exosomes Modulate the Transcriptome and Behaviour of Recipient Stromal Cells and Are Selectively Enriched in miR-202-3p. Gibson SB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 28;10(10):e0141429. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141429>
 54. Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, Schiffer I, Paz H, Fabbri M, et al. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget* [Internet]. 2015 May 10;6(13):11378–94. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3409>
 55. Kumar B, Garcia M, Murakami JL, Chen C-C. Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016 Mar;1863(3):464–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915003109>
 56. Pando A, Reagan JL, Quesenberry P, Fast LD. Extracellular vesicles in leukemia. *Leuk Res* [Internet]. 2018;64(April 2017):52–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.11.011>
 57. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 May 15;123(10):1603–11. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.064386>
 58. Chargaff, E. West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* [Internet]. 1946;166(1):189–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20273687/>
 59. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* [Internet]. 1967 May;13(3):269–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

60. De Broe M, Wieme R, Roels F. MEMBRANE FRAGMENTS WITH KOINOZYMIC PROPERTIES RELEASED FROM VILLOUS ADENOMA OF THE RECTUM. *Lancet* [Internet]. 1975 Dec;306(7946):1214–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673675927099>
61. Benz EW, Moses HL. Brief Communication: Small, Virus-Like Particles Detected in Bovine Sera by Electron Microscopy². *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1974 Jun;52(6):1931–4. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/52.6.1931>
62. Dalton AJ. Microvesicles and Vesicles of Multivesicular Bodies Versus “Virus-Like” Particles. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1975 May;54(5):1137–48. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/933233/Microvesicles>
63. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* [Internet]. 1982 Nov;10(5). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00255932>
64. RONQUIST G, BRODY I, GOTTFRIES A, STEGMAYR B. An Mg²⁺ and Ca²⁺-Stimulated Adenosine Triphosphatase in Human Prostatic Fluid - Part II*. *Andrologia* [Internet]. 2009 Apr 24;10(6):427–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0272.1978.tb03064.x>
65. Taylor DD, Homesley HD DG. Binding of specific peroxidase-labeled antibody to placental-type phosphatase on tumor-derived membrane fragments. *Cancer Res*. 1980;40(11):4064–9.
66. Dvorak H, Quay S, Orenstein N, Dvorak A, Hahn P, Bitzer A, et al. Tumor shedding and coagulation. *Science* (80-) [Internet]. 1981 May 22;212(4497):923–4. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.7195067>
67. Harding C, Heuser J SP. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol*. 1984;35(2):256–63.
68. Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* [Internet]. 1983 Jul;33(3):967–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867483900405>
69. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L TC. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20.
70. Lindenbergh MFS, Stoorvogel W. Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2018 Apr 26;36(1):435–59. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-041015-055700>
71. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2007 Jun 7;9(6):654–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb1596>
72. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence

- for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* [Internet]. 2006 May 2;20(5):847–56. Available from: <http://www.nature.com/articles/2404132>
73. Cai J, Han Y, Ren H, Chen C, He D, Zhou L, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Aug;5(4):227–38. Available from: <https://academic.oup.com/jmcb/article-lookup/doi/10.1093/jmcb/mjt011>
 74. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, Simeon V, Calice G, Raimondo S, et al. MiRNAs and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: a new insight in transplantation. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Feb 9;7(6). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/6791>
 75. Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015 Aug;35:69–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067415000538>
 76. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* [Internet]. 2013 Feb 18;200(4):373–83. Available from: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201211138>
 77. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Sep 7;101(36):13368–73. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403453101>
 78. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Jan 9;(59). Available from: <http://www.jove.com/details.php?id=3037>
 79. Keller S, Ridinger J, Rupp A-K, Janssen JW, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9(1):86. Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-86>
 80. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* [Internet]. 2005 Jul 1;17(7):879–87. Available from: <http://academic.oup.com/intimm/article/17/7/879/675097/Exosomal-like-vesicles-are-present-in-human-blood>
 81. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate* [Internet]. 2009 Feb 1;69(2):159–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20860>
 82. Lässer C, O'Neil SE, Ekerljung L, Ekström K, Sjöstrand M, Lötvall J. RNA-containing Exosomes in Human Nasal Secretions. *Am J Rhinol Allergy* [Internet]. 2011 Mar;25(2):89–93. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2500/ajra.2011.25.3573>
 83. Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzás EI, Di Vizio D, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies:

- building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2017 Dec 15;6(1):1396823. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2017.1396823>
84. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2014 Jan 22;3(1):26913. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v3.26913>
 85. Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2013 Jan 15;2(1):20389. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.20389>
 86. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2011 Aug 11;68(16):2667–88. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-011-0689-3>
 87. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P-J, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget* [Internet]. 2015 May 10;6(13). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3598>
 88. Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* [Internet]. 2013 Aug 1;44(1):11–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12020-012-9839-0>
 89. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
 90. Mateescu B, Kowal EJK, van Balkom BWM, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzás EI, et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2017 Dec 7;6(1):1286095. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2017.1286095>
 91. Lv Y, Tan J, Miao Y, Zhang Q. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2019 Dec 27;23(12):7894–904. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jcmm.14667>
 92. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Mar 25;14(3):195–208. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3622>
 93. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-Derived Microvesicles Promote Regulatory T Cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8 + T Lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 2009 Sep 15;183(6):3720–30. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0900970>
 94. Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2013 Feb

- 1;41(1):245–51. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/41/1/245/68185/Immune-modulation-of-Tcell-and-NK-natural-killer>
95. Whiteside TL. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Feb 29;126(4):1216–23. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/81136>
 96. Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, et al. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 22;9(1):771. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-03224-w>
 97. Chen X, Zhou J, Li X, Wang X, Lin Y, Wang X. Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer cells deliver microRNAs to macrophages and elicit a tumor-promoted phenotype. *Cancer Lett* [Internet]. 2018 Oct;435:80–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383518305135>
 98. Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-1. *Haematologica* [Internet]. 2011 Sep 1;96(9):1302–9. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.039743>
 99. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *J Immunol* [Internet]. 2008 Jun 1;180(11):7249–58. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.11.7249>
 100. Lundholm M, Schröder M, Nagaeva O, Baranov V, Widmark A, Mincheva-Nilsson L, et al. Prostate Tumor-Derived Exosomes Down-Regulate NKG2D Expression on Natural Killer Cells and CD8+ T Cells: Mechanism of Immune Evasion. Busson P, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep 30;9(9):e108925. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0108925>
 101. Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-Released Microvesicles as Vehicles of Immunosuppression: Figure 1. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 1;67(7):2912–5. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-0520>
 102. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, et al. Human Tumor-Released Microvesicles Promote the Differentiation of Myeloid Cells with Transforming Growth Factor- β -Mediated Suppressive Activity on T Lymphocytes. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Sep 15;66(18):9290–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-1819>
 103. Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, et al. Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *J Immunol* [Internet]. 2007 Jun 1;178(11):6867–75. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.178.11.6867>
 104. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* [Internet]. 2002 Jul;360(9329):295–305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602095521>

105. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* [Internet]. 2001 Mar;7(3):297–303. Available from: http://www.nature.com/articles/nm0301_297
106. Giri PK, Schorey JS. Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. Bishai W, editor. *PLoS One* [Internet]. 2008 Jun 18;3(6):e2461. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002461>
107. Muntasell A, Berger AC, Roche PA. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J* [Internet]. 2007 Oct 3;26(19):4263–72. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601842>
108. Nolte-‘t Hoen ENM, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MHM. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* [Internet]. 2009 Feb 26;113(9):1977–81. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/113/9/1977/107987/Activated-T-cells-recruit-exosomes-secreted-by>
109. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding C V, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* [Internet]. 1996 Mar 1;183(3):1161–72. Available from: <https://rupress.org/jem/article/183/3/1161/47827/B-lymphocytes-secrete-antigenpresenting-vesicles>
110. Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, et al. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Dec;120(6):1418–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674907012626>
111. Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candalh C, Dugave C, et al. T84-Intestinal Epithelial Exosomes Bear MHC Class II/Peptide Complexes Potentiating Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 May;132(5):1866–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508507004027>
112. Montecalvo A, Shufesky WJ, Beer Stolz D, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, et al. Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition. *J Immunol* [Internet]. 2008 Mar 1;180(5):3081–90. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.5.3081>
113. Segura E, Guérin C, Hogg N, Amigorena S, Théry C. CD8 + Dendritic Cells Use LFA-1 to Capture MHC-Peptide Complexes from Exosomes In Vivo. *J Immunol* [Internet]. 2007 Aug 1;179(3):1489–96. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.179.3.1489>
114. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* [Internet]. 2002 Dec 11;3(12):1156–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni854>
115. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al.

- ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr Biol* [Internet]. 2009 Dec;19(22):1875–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209017722>
116. Kay JG, Grinstein S. Sensing Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Sensors*. 2011 Jan;11(2):1744–55.
 117. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology*. 2005 Feb;20(1):22–7.
 118. Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira MEC, Barcinski MA. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett*. 2009 Oct;283(2):168–75.
 119. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2015 Jun;25(6):364–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096289241500015X>
 120. Dinkla S, van Cranenbroek B, van der Heijden WA, He X, Wallbrecher R, Dumitriu IE, et al. Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin. *Blood*. 2016 Apr;127(16):1976–86.
 121. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* [Internet]. 2018 Apr;28(8):R435–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982218300927>
 122. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2013 Jan;2(1):20677.
 123. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014 Jun;24(6):766–9.
 124. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 Apr;40:41–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115000373>
 125. Kalra H, Drummen G, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb;17(2):170.
 126. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* [Internet]. 2007 May;21(3):157–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X0600052X>
 127. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 May 20;10(5):619–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb1725>
 128. Van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(4):213–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
 129. Schiera G, Proia P, Alberti C, Mineo M, Savettieri G, Di Liegro I. Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular

- vesicles. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2007 Nov;11(6):1384–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2007.00100.x>
130. Proia P, Schiera G, Mineo M, Ingrassia AMR, Santoro G, Savettieri G, et al. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int J Mol Med* [Internet]. 2008 Jan;21(1):63–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097617>
 131. Wiesner C, El Azzouzi K, Linder S. A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *J Cell Sci* [Internet]. 2013 Jul 1;126(13):2820–33. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.122358>
 132. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):26316. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.26316>
 133. GRANGE C, TAPPARO M, BRUNO S, CHATTERJEE D, QUESENBERRY PJ, TETTA C, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med* [Internet]. 2014 May;33(5):1055–63. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2014.1663>
 134. Nawaz M, Fatima F. Extracellular Vesicles, Tunneling Nanotubes, and Cellular Interplay: Synergies and Missing Links. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2017 Jul 18;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00050/full>
 135. Lösche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets* [Internet]. 2004 Jan 7;15(2):109–15. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537100310001649885>
 136. Jiang J, Kao C-Y, Papoutsakis ET. How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells? *J Control Release* [Internet]. 2017 Feb;247:1–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916306782>
 137. Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ, Sadoul R. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2014 Jan 13;3(1):24722. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v3.24722>
 138. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2014 Jan 4;3(1):24641. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v3.24641>
 139. Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TS. The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2017 Jun;24:97–104. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187962571730007X>
 140. Prada I, Amin L, Furlan R, Legname G, Verderio C, Cojoc D. A new approach to follow a single extracellular vesicle–cell interaction using optical tweezers.

- Biotechniques [Internet]. 2016 Jan 1;60(1). Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114371>
141. French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2017 Jul;67:48–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952117300034>
 142. Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, et al. Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep* [Internet]. 2015 Feb 7;16(2):213–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embr.201439668>
 143. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 Mar 22;108(12):4852–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017667108>
 144. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2011 Nov 22;89(8):836–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/icb.2011.20>
 145. Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 3;5(1):10300. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep10300>
 146. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2014 Oct 11;30(1):255–89. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
 147. Prada I, Meldolesi J. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Aug 9;17(8):1296. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/8/1296>
 148. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassarà D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* [Internet]. 18(5A):3433–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858920>
 149. Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res* [Internet]. 19(4C):3439–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629632>
 150. Friend C, Marovitz W, Henie G, Henie W, Tsuei D, Hirschhorn K, et al. Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer Res* [Internet]. 1978 Aug;38(8):2581–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/78764>
 151. Poste G, Nicolson GL. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1980 Jan 1;77(1):399–403. Available from:

- <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.77.1.399>
152. van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med* [Internet]. 67(7):266–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687520>
 153. Hong C-S, Funk S, Muller L, Boyiadzis M, Whiteside TL. Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2016 Jan 24;5(1):29289. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.29289>
 154. Hong C-H, Chiu Y-W, Zhao J-K, Jou S-J, Wang W-T, Lee R. A low-power charge sharing hierarchical bitline and voltage-latched sense amplifier for SRAM macro in 28 nm CMOS technology. In: 2014 27th IEEE International System-on-Chip Conference (SOCC) [Internet]. IEEE; 2014. p. 160–4. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6948919/>
 155. Viola S, Traer E, Huan J, Hornick NI, Tyner JW, Agarwal A, et al. Alterations in acute myeloid leukaemia bone marrow stromal cell exosome content coincide with gains in tyrosine kinase inhibitor resistance. *Br J Haematol* [Internet]. 2016 Mar;172(6):983–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.13551>
 156. Corrado C, Saieva L, Raimondo S, Santoro A, De Leo G, Alessandro R. Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2016 Oct;20(10):1829–39. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12873>
 157. Taverna S, Flugy A, Saieva L, Kohn EC, Santoro A, Meraviglia S, et al. Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 May 1;130(9):2033–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.26217>
 158. Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells. Zimmer J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Feb 25;6(2):e16899. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016899>
 159. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 Jan 1;4(1):27066. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.27066>
 160. Lee Y, EL Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012 Oct 15;21(R1):R125–34. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/dds317>
 161. Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol* [Internet]. 2018 Dec 13;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02723/full>
 162. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators.

- Blood [Internet]. 2012 Oct 11;120(15):e60–72. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/15/e60/30655/Specific-lipid-mediator-signatures-of-human>
163. Timár CI, Lőrincz ÁM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood* [Internet]. 2013 Jan 17;121(3):510–8. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/121/3/510/31003/Antibacterial-effect-of-microvesicles-released>
 164. Dalli J, Montero-Melendez T, Norling L V, Yin X, Hinds C, Haskard D, et al. Heterogeneity in Neutrophil Microparticles Reveals Distinct Proteome and Functional Properties. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013 Aug;12(8):2205–19. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M113.028589>
 165. Pitanga T, de Aragão França L, Rocha VC, Meirelles T, Matos Borges V, Gonçalves M, et al. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2014;15(1):21. Available from: <http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-15-21>
 166. Butin-Israeli V, Houser MC, Feng M, Thorp EB, Nusrat A, Parkos CA, et al. Deposition of microparticles by neutrophils onto inflamed epithelium: a new mechanism to disrupt epithelial intercellular adhesions and promote transepithelial migration. *FASEB J* [Internet]. 2016 Dec 23;30(12):4007–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201600734R>
 167. Slater TW, Finkielstein A, Mascarenhas LA, Mehl LC, Butin-Israeli V, Sumagin R. Neutrophil Microparticles Deliver Active Myeloperoxidase to Injured Mucosa To Inhibit Epithelial Wound Healing. *J Immunol* [Internet]. 2017 Apr 1;198(7):2886–97. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601810>
 168. Pliyev BK, Kalintseva M V., Abdulaeva S V., Yarygin KN, Savchenko VG. Neutrophil microparticles modulate cytokine production by natural killer cells. *Cytokine* [Internet]. 2014 Feb;65(2):126–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613007606>
 169. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* [Internet]. 2004 Oct 15;104(8):2543–8. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/104/8/2543/19106/Activated-polymorphonuclear-neutrophils>
 170. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, Oehri I, Hess C, Schifferli JA. Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* [Internet]. 2008 Jan 15;180(2):817–24. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.2.817>
 171. Lim K, Sumagin R, Hyun Y-M. Extravasating Neutrophil-derived Microparticles Preserve Vascular Barrier Function in Inflamed Tissue. *Immune Netw* [Internet]. 2013;13(3):102. Available from: <https://immunetwork.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2013.13.3.102>

172. Dalli J, Norling L V., Renshaw D, Cooper D, Leung K-Y, Perretti M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 15;112(6):2512–9. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/112/6/2512/24904/Annexin-1-mediates-the-rapid-antiinflammatory>
173. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin $\alpha M\beta 2$ (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 15;112(6):2327–35. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/112/6/2327/24888/Expression-activation-and-function-of-integrin>
174. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, et al. Endotoxins Stimulate Neutrophil Adhesion Followed by Synthesis and Release of Platelet-activating Factor in Microparticles. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Aug 29;278(35):33161–8. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M305321200>
175. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte Derived Microvesicles Deliver a Cell Death Message via Encapsulated Caspase-1. Unutmaz D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Sep 25;4(9):e7140. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0007140>
176. Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* [Internet]. 2013 Feb 7;121(6):984–95. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/121/6/984/31436/Macrophage-microvesicles-induce-macrophage>
177. Teo BHD, Wong SH. MHC class II-associated invariant chain (Ii) modulates dendritic cells-derived microvesicles (DCMV)-mediated activation of microglia. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010 Oct;400(4):673–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10016475>
178. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding C V., Nunez G, et al. P2X7 Receptor-Stimulated Secretion of MHC Class II-Containing Exosomes Requires the ASC/NLRP3 Inflammasome but Is Independent of Caspase-1. *J Immunol* [Internet]. 2009 Apr 15;182(8):5052–62. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0802968>
179. Neri T, Armani C, Pegoli A, Cordazzo C, Carmazzi Y, Brunelleschi S, et al. Role of NF- κ B and PPAR- in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles. *Eur Respir J* [Internet]. 2011 Jun 1;37(6):1494–502. Available from: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00023310>
180. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/Macrophage-Derived Microparticles Up-Regulate Inflammatory Mediator Synthesis by Human Airway Epithelial Cells. *J Immunol* [Internet]. 2006 Aug 1;177(3):1975–80. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.177.3.1975>
181. Eyre J, Burton JO, Saleem MA, Mathieson PW, Topham PS, Brunskill NJ. Monocyte- and Endothelial-Derived Microparticles Induce an Inflammatory Phenotype in Human Podocytes. *Nephron Exp Nephrol* [Internet]. 2011;119(3):e58–66. Available from:

- <https://www.karger.com/Article/FullText/329575>
182. Bardelli C, Amoruso A, Federici Canova D, Fresu L, Balbo P, Neri T, et al. Autocrine activation of human monocyte/macrophages by monocyte-derived microparticles and modulation by PPAR γ ligands. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2012 Feb;165(3):716–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01593.x>
 183. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. Trypanosoma cruzi Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 15;188(4):1942–52. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1102053>
 184. N.M. Nolte-‘t Hoen E, H.M. Wauben M. Immune Cell-derived Vesicles: Modulators and Mediators of Inflammation. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012 Apr 1;18(16):2357–68. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=18&issue=16&spage=2357>
 185. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, et al. TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ ζ Complex. *J Immunol* [Internet]. 2002 Apr 1;168(7):3235–41. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.168.7.3235>
 186. Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, Gruaz L, Dayer J-M, Burger D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Jan 22;83(4):921–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0807551>
 187. Shefler I, Pasmanik-Chor M, Kidron D, Mekori YA, Hershko AY. T cell-derived microvesicles induce mast cell production of IL-24: Relevance to inflammatory skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Jan;133(1):217–24.e3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913006829>
 188. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, Mekori YA. T Cell-Induced Mast Cell Activation: A Role for Microparticles Released from Activated T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2010 Oct 1;185(7):4206–12. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1000409>
 189. Martin S, Tesse A, Hugel B, Martínez MC, Morel O, Freyssinet J-M, et al. Shed Membrane Particles From T Lymphocytes Impair Endothelial Function and Regulate Endothelial Protein Expression. *Circulation* [Internet]. 2004 Apr 6;109(13):1653–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000124065.31211.6E>
 190. Mostefai HA, Agouni A, Carusio N, Mastronardi ML, Heymes C, Henrion D, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Xanthine Oxidase Regulate Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Productions by Apoptotic Lymphocyte Microparticles in Endothelial Cells. *J Immunol* [Internet]. 2008 Apr 1;180(7):5028–35. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.7.5028>
 191. Qiu Q, Xiong W, Yang C, Gagnon C, Hardy P. Lymphocyte-derived microparticles induce bronchial epithelial cells’ pro-inflammatory cytokine production and apoptosis. *Mol Immunol* [Internet]. 2013 Oct;55(3-4):220–30.

- Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589013000370>
192. Qiu Q, Xiong W, Yang C, Dai X, Dan X, Yang Z, et al. Lymphocyte-derived microparticles induce apoptosis of airway epithelial cells through activation of p38 MAPK and production of arachidonic acid. *Apoptosis* [Internet]. 2014 Jul 29;19(7):1113–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-014-0993-0>
 193. Qiu Q, Yang C, Xiong W, Tahiri H, Payeur M, Superstein R, et al. SYK is a target of lymphocyte-derived microparticles in the induction of apoptosis of human retinoblastoma cells. *Apoptosis* [Internet]. 2015 Dec 24;20(12):1613–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-015-1177-2>
 194. Alonso R, Mazzeo C, Rodriguez MC, Marsh M, Fraile-Ramos A, Calvo V, et al. Diacylglycerol kinase α regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. *Cell Death Differ* [Internet]. 2011 Jul 21;18(7):1161–73. Available from: <http://www.nature.com/articles/cdd2010184>
 195. Busch A, Quast T, Keller S, Kolanus W, Knolle P, Altevogt P, et al. Transfer of T Cell Surface Molecules to Dendritic Cells upon CD4 + T Cell Priming Involves Two Distinct Mechanisms. *J Immunol* [Internet]. 2008 Sep 15;181(6):3965–73. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.181.6.3965>
 196. Monleón I, Martínez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taulés M, Iturralde M, et al. Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2001 Dec 15;167(12):6736–44. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.167.12.6736>
 197. Xie Y, Zhang H, Li W, Deng Y, Munegowda MA, Chibbar R, et al. Dendritic Cells Recruit T Cell Exosomes via Exosomal LFA-1 Leading to Inhibition of CD8 + CTL Responses through Downregulation of Peptide/MHC Class I and Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J Immunol* [Internet]. 2010 Nov 1;185(9):5268–78. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1000386>
 198. Goncharov N V., Nadeev AD, Jenkins RO, Avdonin P V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017;2017:1–27. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/9759735/>
 199. Duval A, Helley D, Capron L, Youinou P, Renaudineau Y, Dubucquoi S, et al. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheumatology* [Internet]. 2010 Jun 1;49(6):1049–55. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/keq041>
 200. Deng F, Wang S, Zhang L. Endothelial microparticles act as novel diagnostic and therapeutic biomarkers of circulatory hypoxia-related diseases: a literature review. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2017 Sep;21(9):1698–710. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.13125>
201. Gelderman MP, Simak J. Flow Cytometric Analysis of Cell Membrane Microparticles. In 2008. p. 79–93. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-398-1_6
 202. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem* [Internet]. 1990 Mar 5;265(7):3809–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105954>
 203. Abid Hussein MN, Böing AN, Biró É, Hoek FJ, Vogel GMT, Meuleman DG, et al. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res* [Internet]. 2008 Jan;121(6):865–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384807003210>
 204. Yamamoto S, Niida S, Azuma E, Yanagibashi T, Muramatsu M, Huang TT, et al. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Jul 17;5(1):8505. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep08505>
 205. Combes V, Simon A-C, Grau G-E, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Jul 1;104(1):93–102. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/4985>
 206. Lu Y, Li L, Yan H, Su Q, Huang J, Fu C. Endothelial microparticles exert differential effects on functions of Th1 in patients with acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* [Internet]. 2013 Oct;168(6):5396–404. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527313016008>
 207. Angelot F, Seilles E, Biichle S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* [Internet]. 2009 Nov 1;94(11):1502–12. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2009.010934>
 208. Chistiakov DA, Orekhov AN, Sobenin IA, Bobryshev Y V. Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol* [Internet]. 2014 Jul 25;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00279/abstract>
 209. Wheway J, Latham SL, Combes V, Grau GER. Endothelial Microparticles Interact with and Support the Proliferation of T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2014 Oct 1;193(7):3378–87. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1303431>
 210. Costa-Filho RC, Bozza FA. Platelets: an outlook from biology through evidence-based achievements in critical care. *Ann Transl Med* [Internet]. 2017 Nov;449–449. Available from: <http://atm.amegroups.com/article/view/17450/17774>
 211. Kornek M, Schuppan D. Microparticles: Modulators and biomarkers of liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2012 Nov;57(5):1144–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827812006058>
 212. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-

- derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* [Internet]. 2001 Apr;85(4):639–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11341498>
213. Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem* [Internet]. 2018 Apr;546:78–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269718300691>
 214. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* [Internet]. 1997 May 1;99(9):2118–27. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/119385>
 215. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Jul 1;102(1):136–44. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/2592>
 216. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* [Internet]. 1989 Jun 1;83(6):2008–17. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/114111>
 217. Rahman A, Fazal F. Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2009 Apr;11(4):823–39. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2008.2204>
 218. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2005 Jul;25(7):1512–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37>
 219. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* [Internet]. 2000 Feb 15;95(4):1317–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666205>
 220. Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* [Internet]. 2008 Jan 7;19(2):96–103. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537100701777295>
 221. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. *Science* (80-) [Internet]. 2010 Jan 29;327(5965):580–3. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1181928>
 222. Balvers K, Curry N, Kleinveld DJB, Böing AN, Nieuwland R, Goslings JC, et al. Endogenous Microparticles Drive the Proinflammatory Host Immune Response in Severely Injured Trauma Patients. *Shock* [Internet]. 2015 Apr;43(4):317–21. Available from: <http://journals.lww.com/00024382-201504000-00003>
 223. Ståhl A, Sartz L, Karpman D. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood* [Internet]. 2011 May 19;117(20):5503–13. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/117/20/5503/21223/Complement->

- activation-on-plateletleukocyte
224. Badimon L, Suades R, Arderiu G, Peña E, Chiva-Blanch G, Padró T. Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2017 Dec 18;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcvm.2017.00077/full>
 225. Sadallah S, Eken C, Martin PJ, Schifferli JA. Microparticles (Ectosomes) Shed by Stored Human Platelets Downregulate Macrophages and Modify the Development of Dendritic Cells. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jun 1;186(11):6543–52. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1002788>
 226. Ceroi A, Delettre FA, Marotel C, Gauthier T, Asgarova A, Biichle S, et al. The anti-inflammatory effects of platelet-derived microparticles in human plasmacytoid dendritic cells involve liver X receptor activation. *Haematologica* [Internet]. 2016 Mar 1;101(3):e72–6. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2015.135459>
 227. Dinkla S, van Cranenbroek B, van der Heijden WA, He X, Wallbrecher R, Dumitriu IE, et al. Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin. *Blood* [Internet]. 2016 Apr 21;127(16):1976–86. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/16/1976/34846/Platelet-microparticles-inhibit-IL17-production-by>
 228. Li K-Y, Zheng L, Wang Q, Hu Y-W. Characteristics of erythrocyte-derived microvesicles and its relation with atherosclerosis. *Atherosclerosis* [Internet]. 2016 Dec;255:140–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915016314460>
 229. Livaja Koshiar R, Somajo S, Norström E, Dahlbäck B. Erythrocyte-Derived Microparticles Supporting Activated Protein C-Mediated Regulation of Blood Coagulation. Miyata T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 19;9(8):e104200. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104200>
 230. Larson MC, Hillery CA, Hogg N. Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014 Aug;73:214–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584914001865>
 231. Zecher D, Cumpelik A, Schifferli JA. Erythrocyte-Derived Microvesicles Amplify Systemic Inflammation by Thrombin-Dependent Activation of Complement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2014 Feb;34(2):313–20. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.113.302378>
 232. Willekens FLA, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, van den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* [Internet]. 2005 Mar 1;105(5):2141–5. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/105/5/2141/20295/Liver-Kupffer-cells-rapidly-remove-red-blood>
 233. Spronk HMH, ten Cate H, van der Meijden PEJ. Differential roles of Tissue Factor and Phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thromb Res* [Internet]. 2014 May;133:S54–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384814001479>

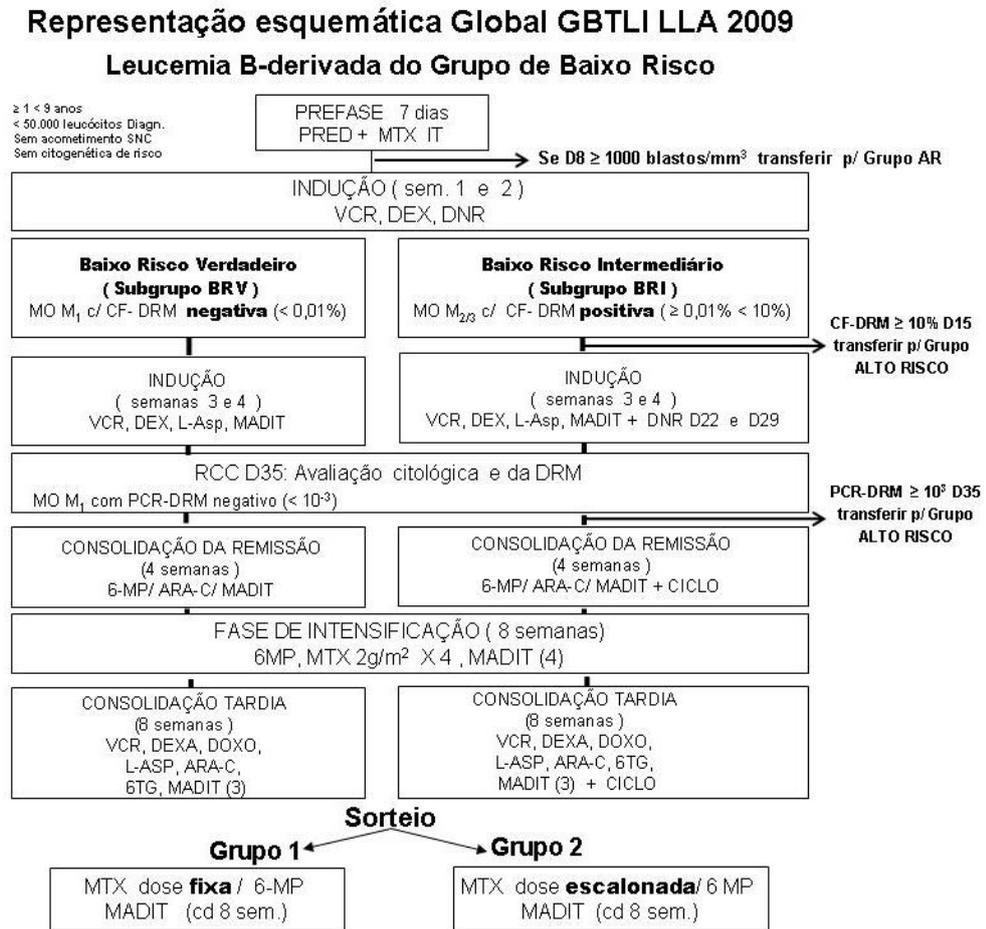
234. Levin G, Sukhareva E, Lavrentieva A. Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2016 Apr 21;41(3):452–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11239-015-1299-y>
235. Potor L, Bányai E, Becs G, Soares MP, Balla G, Balla J, et al. Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013;2013:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/676425/>
236. Xiong Z, Cavaretta J, Qu L, Stolz DB, Triulzi D, Lee JS. Red blood cell microparticles show altered inflammatory chemokine binding and release ligand upon interaction with platelets. *Transfusion* [Internet]. 2011 Mar;51(3):610–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2010.02861.x>
237. Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, Vascular Function, and Atherothrombosis. Weber C, Mause S, editors. *Circ Res* [Internet]. 2011 Aug 19;109(5):593–606. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.233163>
238. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2015 Jun 11;125(24):3805–14. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/125/24/3805/34006/Circulating-cell-membrane-microparticles-transfer>
239. Loyer X, Vion A-C, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as Cell–Cell Messengers in Cardiovascular Diseases. *Circ Res* [Internet]. 2014 Jan 17;114(2):345–53. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.113.300858>
240. Soung Y, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2017 Jan 12;9(12):8. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/9/1/8>
241. Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumor Biol* [Internet]. 2015 Dec 9;36(12):9739–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3741-3>
242. George P, Hernandez K, Hustu O, Borella L, Holton C, Pinkel D. A study of “total therapy” of acute lymphocytic leukemia in children. *J Pediatr* [Internet]. 1968 Mar;72(3):399–408. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347668802173>
243. Pui C-H, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia without Cranial Irradiation. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jun 25;360(26):2730–41. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0900386>
244. Mörücke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* [Internet]. 2008 May

- 1;111(9):4477–89. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/111/9/4477/24468/Riskadjusted-therapy-of-acute-lymphoblastic>
245. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2017;60(5):129. Available from: <http://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2017.60.5.129>
 246. Guimarães Júnior MH, Ferrari TCA, Teixeira-Carvalho A, Moreira M de L, de Souza Santos LJ, Costa-Silva MF, et al. Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: Role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission. *J Infect* [Internet]. 2019 Aug;79(2):101–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445319301859>
 247. Sheu B-C. Cytokine regulation networks in the cancer microenvironment. *Front Biosci* [Internet]. 2008;Volume(13):6255. Available from: <http://www.bioscience.org/2008/v13/af/3152/list.htm>
 248. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 Sep 30;17(9):559–72. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri.2017.49>
 249. Vale AM, Schroeder HW. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010 Apr;125(4):778–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674910003611>
 250. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children’s Oncology Group study. *Blood* [Internet]. 2008 Jun 15;111(12):5477–85. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/111/12/5477/23818/Clinical-significance-of-minimal-residual-disease>
 251. Cherian S, Hedley BD, Keeney M. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2019 Nov 7;96(6):449–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cyto.b.21854>
 252. Greaves MF, Brown G, Rapson NT, Lister TA. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. 1975 May;4(1):67–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0090122975900410>
 253. Ritz J, Pesando JM, Notis-McConarty J, Lazarus H, Schlossman SF. A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature* [Internet]. 1980 Feb;283(5747):583–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/283583a0>
 254. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, et al. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1991 Dec 1;88(23):10662–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.23.10662>
 255. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Jul 29;111(3):506–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2014289>
 256. Jang TJ, Park JB, Lee JI. The Expression of CD10 and CD15 Is Progressively

- Increased during Colorectal Cancer Development. Korean J Pathol [Internet]. 2013;47(4):340. Available from: <http://www.jpatholm.org/journal/view.php?doi=10.4132/KoreanJPathol.2013.47.4.340>
257. Jana S, Jha B, Patel C, Jana D, Agarwal A. CD10-A new prognostic stromal marker in breast carcinoma, its utility, limitations and role in breast cancer pathogenesis. Indian J Pathol Microbiol [Internet]. 2014;57(4):530. Available from: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2014/57/4/530/142639>
258. Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Fujiwara R, Kitayoshi M, Tanabe E, et al. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. J Surg Res [Internet]. 2014 Dec;192(2):390–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002248041400537X>
259. Dall’Era MA, True LD, Siegel AF, Porter MP, Sherertz TM, Liu AY. Differential expression of CD10 in prostate cancer and its clinical implication. BMC Urol [Internet]. 2007 Dec 2;7(1):3. Available from: <https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2490-7-3>
260. Tse GMK. Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. J Clin Pathol [Internet]. 2005 Feb 1;58(2):185–9. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2004.020917>

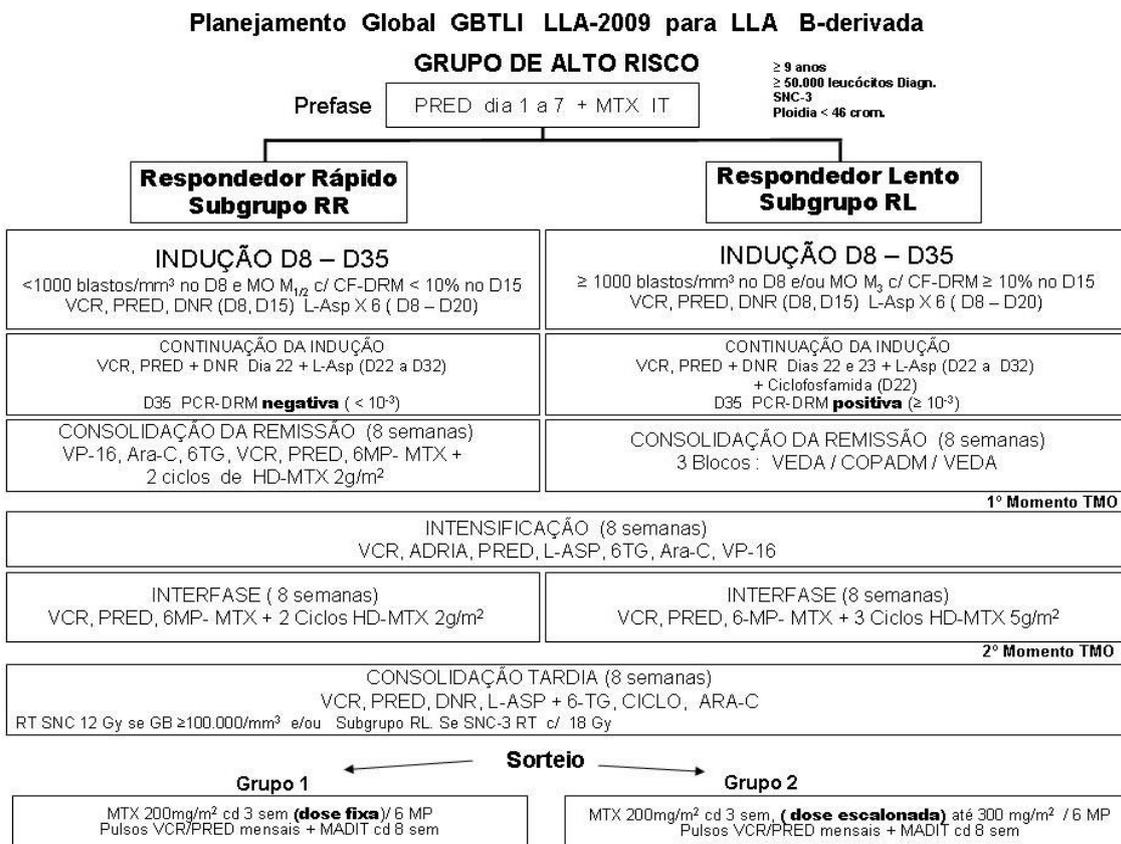
12. ANEXOS

Anexo Ia. Representação esquemática Global do Protocolo GBTLI LLA-2009, Leucemia B-derivada do Grupo de Baixo Risco de recidiva (BR).



Fonte: Protocolo GBTLI-2009.

Anexo Ib. Representação esquemática Global do Protocolo GBTLI LLA-2009, Leucemia B-derivada do Grupo de Alto Risco de recidiva (AR).



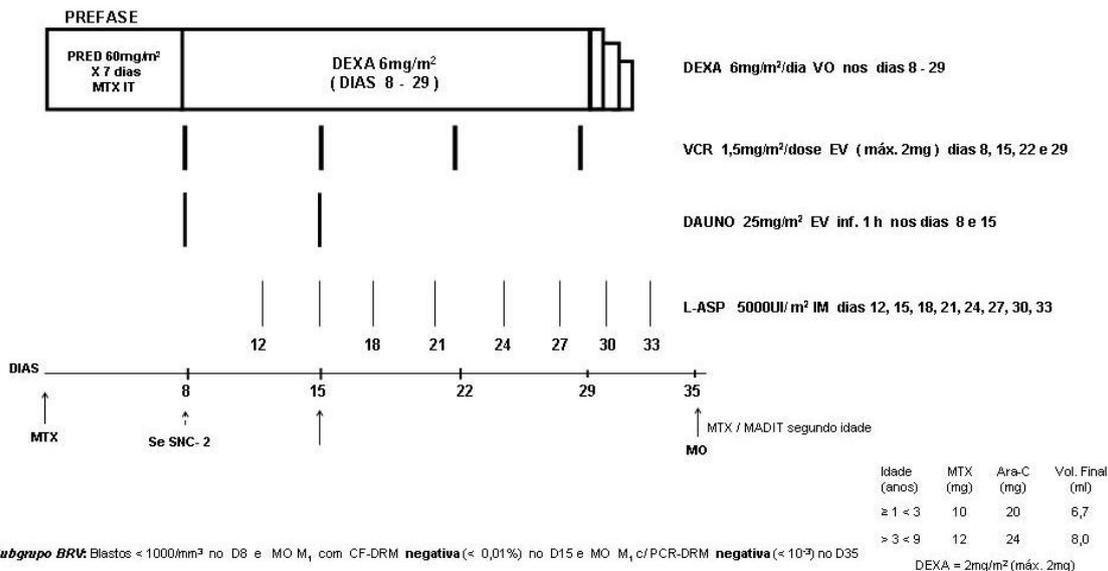
Fonte: Protocolo GBTLI-2009.

Anexo IIa. Representação esquemática da terapia da Pré-fase e da Indução do Protocolo GBTLI LLA-2009 para a LLA B-derivada do Grupo de BR de recidiva.

Esquema Terapêutico do GBTLI LLA-2009 para a Leucemia B-derivada - Grupo de Baixo Risco
Baixo Risco Verdadeiro (Subgrupo BRV)

Peso: ___ kg Est: ___ cm SC: ___

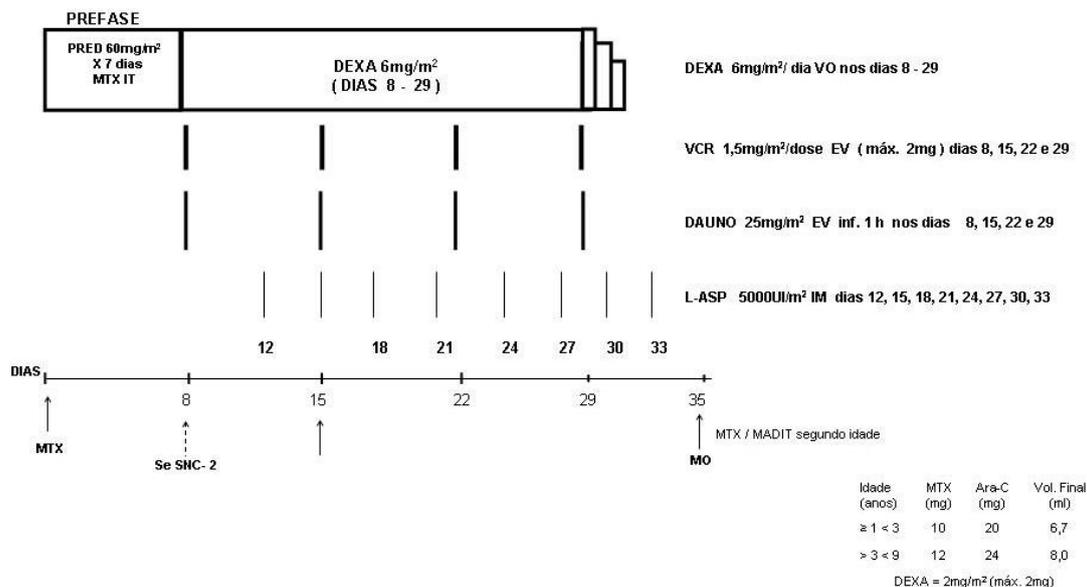
PREFASE E TERAPIA DE INDUÇÃO



Esquema Terapêutico do GBTLI LLA-2009 para a Leucemia B-derivada - Grupo de Baixo Risco
Baixo Risco Intermediário (Subgrupo BRI)

Peso: ___ kg Est: ___ cm SC: ___

PREFASE E TERAPIA DE INDUÇÃO



Fonte: Protocolo GBTLI-2009.

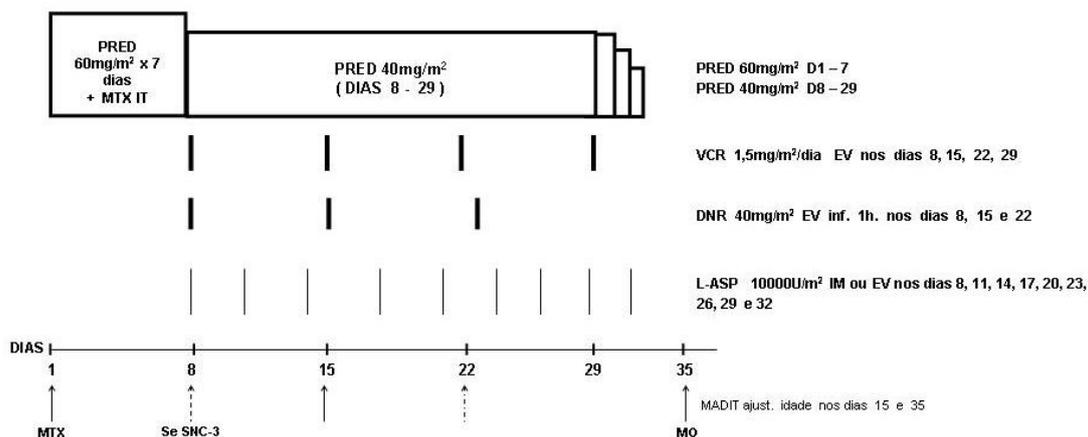
Anexo IIIb. Representação esquemática da terapia da Pré-fase e da Indução do Protocolo GBTLI LLA-2009 para a LLA B-derivada do Grupo de AR de recidiva.

Esquema Terapêutico GBTLI LLA-2009 para a Leucemia B-derivada - Grupo de Alto Risco

Respondedor Rápido (Subgrupo RR)

Peso: ___ kg Est: ___ cm SC: ___

PREFASE E TERAPIA DE INDUÇÃO



Idade (anos)	MTX (mg)	Ara-C (mg)	Vol. Final (ml)
≥ 1 < 3	10	20	6,7
> 3 < 9	12	24	8,0
> 9	15	30	10

DEXA = 2mg/m² (máx. 2mg)

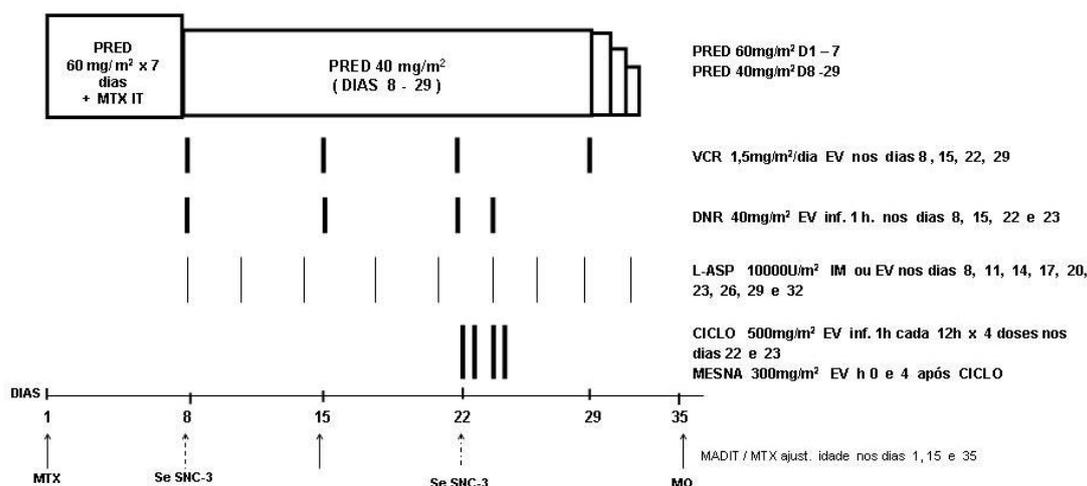
Subgrupo RR: Blastos < 1000/mm³ no D8 e MO M_{1/2} com CF-DRM < 10% no D15 e MO M₁ c/ PCR-DRM **negativa** (< 10⁻³) no D35

Esquema Terapêutico GBTLI LLA-2009 para a Leucemia B-derivada - Grupo de Alto Risco

Respondedor Lento (Subgrupo RL)

Peso: ___ kg Est: ___ cm SC: ___

PREFASE E TERAPIA DE INDUÇÃO



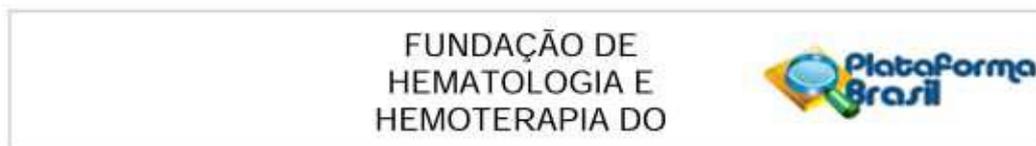
Idade (anos)	MTX (mg)	Ara-C (mg)	Vol. Final (ml)
≥ 1 < 3	10	20	6,7
> 3 < 9	12	24	8,0
> 9	15	30	10

DEXA = 2mg/m² (máx. 2mg)

Subgrupo RL: ≥ 1000 blastos/mm³ no D8 e/ou MO M₃ com CF-DRM ≥ 10% no D15 e/ou MO M_{2/3} com PCR-DRM **positiva** (≥ 10⁻³) no D35

Fonte: Protocolo GBTLI-2009.

Anexo III. Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS

Pesquisador: MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO CARVALHO

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 18309913.6.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 739.563

Data da Relatoria: 24/07/2014

Apresentação do Projeto:

É um estudo não experimental, longitudinal de coorte e prospectivo, onde os pacientes serão acompanhados de acordo com o intervalo de tempo compreendido entre o diagnóstico e o dia 35 da indução. A hipótese já formulada pela pesquisadora irá procurar demonstrar a intensidade da imunossupressão do tratamento em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos com LLA, nos diferentes grupos de risco de tratamento, na fase de indução do protocolo GBTLI-LLA 2009.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a resposta imune de acordo com os grupos de risco do tratamento com o protocolo GBTLI-LLA 2009, em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA durante a terapia de indução.

Objetivo Secundário:

1. Caracterizar as populações celulares de LT (LTCD4+ LTCD8+, NK e LTreg CD4/CD25/FoxP3) em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA ao diagnóstico, D15 e final da terapia de indução(D35) do protocolo GBTLI-LLA 2009;
2. Determinar o perfil de citocinas séricas(Th1, Th2, Treg e Th17) na população de pacientes durante o protocolo de indução (D0, D15 e D35);

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0113 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 739.563

3. Relacionar o perfil da resposta imune com os grupos de risco de tratamento da terapia de indução em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA em uso do protocolo GBTLI-LLA 2009.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Existem riscos como formação de hematomas, ecimoses (manchas arroxeadas), no local da punção, próprios da coleta das amostras de sangue que fazem parte da rotina de seus exames.

Benefícios:

Proporcionar para outras crianças com LLA a possibilidade de um melhor tratamento no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta pesquisa se mostra muito interessante do ponto de vista científico pois nos proporcionará conhecer o perfil imunológico dos pacientes antes do início do tratamento e acompanhar sua alteração no decorrer do mesmo; fornecendo informações muito valiosas para o sucesso do tratamento e uma eventual intervenção caso algum exame aponte uma infecção.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado após as devidas correções.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0113 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Anexo IV. Protocolo de Purificação e Imunofenotipagem de Microvesículas do GIPB.**Protocolo de Purificação e Imunofenotipagem de Microvesículas**Coleta sangue

1. Coletar o sangue em tubos de citrato;
2. Centrifugar o sangue a 3500 rpm por 15 minutos, T.A.;
3. Coletar o plasma (plasma pobre em plaquetas e armazenar a -70°C).

Experimento microvesículas

1. Obtenção do plasma livre de plaquetas: descongelar a amostra de plasma pobre em plaquetas em banho-maria 36°C;
2. Aliquotar 700µl (para sepse) ou 600µl (para endocardite) do PPP em eppendorfs;
3. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, T.A.;
4. Identificar tubos para cada uma das marcações:
 - No sepse: 6 tubos se a leitura for no FACScan, 5 se a leitura no no FACScalibur.
 - São 4 tempos por paciente.**
 - Na endocardite: 5 tubos se a leitura for no FACScan, 4 se a leitura no no FACScalibur.
 - São 3 tempos por paciente e mais um controle doente.**
5. Preparar tampão citrato-heparina:

Tampão Citrato-Heparina:

2mL de citrato aproximadamente (+/- 4 tubos de coleta), 4µL de heparina (5000 unidades) e completar o volume para 20mL com PBS 1x.
6. Aliquotar 300µl deste tampão em cada tubo;
7. Coletar 100µl do sobrenadante e distribuir em cada eppendorf contendo 300µl de tampão citrato-heparina (1 eppendorf por marcação para cada amostra).
8. Centrifugar a 15000 rpm por 90 minutos, 15°C;
9. Colorir placa e pipetar anticorpos: Anticorpos (4µL) e a Anexina (2,5µL para endocardite e 1,5µl para sepse).

Painel SEPSE: FACScalibur

Tubo 1: Anexina
 Tubo 2: CD66PE, CD45APC
 Tubo 3: CD51/61PE, CD235 PECy5 (diluído)
 Tubo 4: CD3PE, CD41PerCP
 Tubo 5: CD16PE, CD14PerCP

Painel SEPSE: FACScan

Tubo 1: Anexina
 Tubo 2: CD66PE
 Tubo 3: CD51/61PE, CD235 PECy5 (diluído)
 Tubo 4: CD3PE, CD41PerCP
 Tubo 5: CD16PE, CD14PerCP
 Tubo 6: CD45PE

Painel Endocardite: FACScalibur

Tubo 1: Anexina

Tubo 2: CD66PE, CD14 PerCP, CD45 APC

Tubo 3: CD51/61PE, CD235 PECy5 (diluído)

Tubo 4: CD3PE, CD41PerCP

Painel SEPSE: FACScan

Tubo 1: Anexina

Tubo 2: CD66PE, CD14PerCP

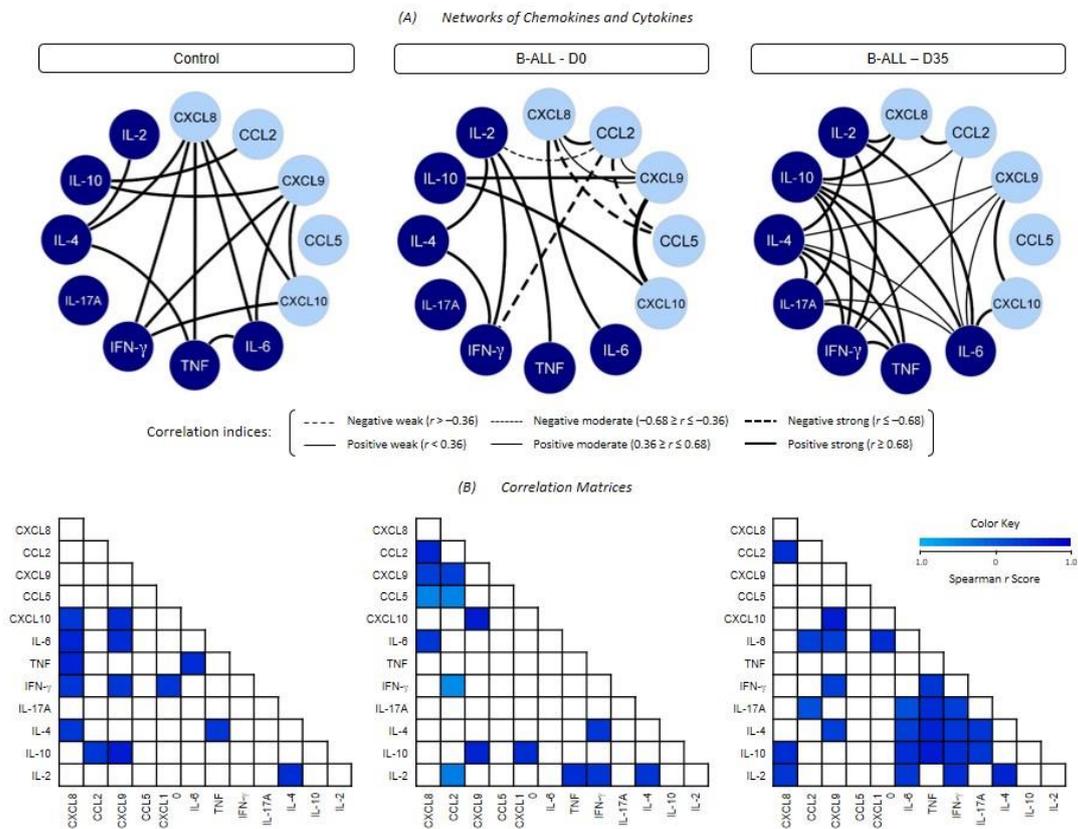
Tubo 3: CD51/61PE, CD235 PECy5 (diluído)

Tubo 4: CD3PE, CD41PerCP

Tubo 5: CD45PE

10. Preparar beads:
 - 300µl de PBS1X e 0,5µl de beads;
 - Diluir 150µl deste preparo de beads em 150µl de PBS1X.
11. Preparar o tampão anexina:
 - Tampão de ligação da anexina:*
 - Diluir 10x em água de injeção (fazer 30mL para 48 poços).
12. Remover o sobrenadante com a pipeta (retirar aproximadamente 350ul de sobrenadante) e ressuspender os pellets em 100µL de tampão anexina;
13. Aplicar 100µl da suspensão de microvesículas nos poços da placa contendo os anticorpos;
14. Incubar por 30 minutos ao abrigo da luz, T.A.;
15. Adicionar 300µl de tampão de ligação de anexina nos poços e transferir para microtubos de citometria;
16. Analisar no citômetro 1 minuto por amostra.

Anexo V. Rede integrativa de quimiocinas e citocinas em pacientes com LLA-B durante a terapia de indução da remissão (Dados não publicados - Em revisão por pares).



Fonte: Magalhães-Gama et al., 2021.

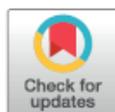
Anexo VI. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths (doi: 10.1371/journal.pone.0221518).



RESEARCH ARTICLE

Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths

Alexander Leonardo Silva-Junior^{1,2}✉, Fabíola Silva Alves^{1,2}✉, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fábio Magalhães Gama^{1,3}, Maria Gabriela Almeida Rodrigues^{4,5}, Alexandre Santos Torres¹, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,3}, Vanderson Souza Sampaio^{4,5,6}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Nelson Abrahim Fraiji^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2,3}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5}✉



1 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **5** Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil

OPEN ACCESS

Citation: Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. (2019) Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. PLoS ONE 14(8): e0221518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518>

Editor: Elias Jabbour, M D Anderson Cancer Center, UNITED STATES

Received: March 7, 2019

Accepted: August 8, 2019

Published: August 22, 2019

Copyright: © 2019 Silva-Junior et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Due to ethical restrictions regarding patient privacy, data are available upon request. Data are available upon request from the Ethics Committee of Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM - cepheoam@gmail.com), for researchers who meet the criteria for access to confidential data. Additional requests for the data may be sent to the corresponding author or coauthors Allyson G. Costa (allyson.gui.costa@gmail.com); Adriana Malheiro

✉ These authors contributed equally to this work.

* allyson.gui.costa@gmail.com

Abstract

Introduction

Leukemia is the most common cancer in children and has the highest rates of incidence in industrialized countries, followed by developing countries. This epidemiologic profile can mainly be attributed to the availability of diagnostic resources. In Brazil, leukemia diagnosis is a challenge due to financial viability, lack of hemovigilance services in isolated regions and the vast size of the territory. Its incidence in the state of Amazonas has been increasing since 2010. Therefore, this study aims to describe the epidemiological pattern and spatial distribution of patients with acute lymphoid leukemia and acute myeloid leukemia in Amazonas and identify the predictors of comorbidity and death.

Materials and methods

A retrospective cross-sectional study was carried out based on patients' data which was obtained from the database of a referral center for the period of 2005 to 2015. Variables included age, gender, ethnicity, civil status, schooling, income, location of residence, sub-type of leukemia, comorbidities, and date of death. The spatial distribution was performed using QGIS v.2.18. Stata software was used for univariable and multivariable logistic regression to evaluate the association between both comorbidities and death for all characteristic groups of ALL and AML.

Anexo VII. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon (doi: doi.org/10.1038/s41598-021-89310-4).

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon

Fabiola Silva Alves^{1,2}, Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Gláucia Lima Souza^{1,2}, Daniele Sá Pereira², Fábio Magalhães-Gama³, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago^{1,2}, Nadja Pinto Garcia², Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,4}, Maurício Morishi Ogusku^{4,5}, Aya Sadahiro³, Adriana Malheiro^{1,2,3,4,6} & Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,6,7,8}✉

The immune system plays an important role in the control of cancer development. To investigate the possible association of inflammasome genes to childhood leukemia we performed a case-control study with 158 patients with acute lymphoblastic leukemia and 192 healthy individuals. The *IL1B* and *IL18* genetic polymorphisms were genotyped by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and *NLRP1*, *NLRP3* and *P2RX7* were genotyped using Real Time quantitative PCR (qPCR). The *IL1B* C/T rs19644 genotype was associated with the risk of developing ALL (C/C vs. C/T+T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26–4.88, $p=0.006$]; C/C vs C/T OR: 2.74 [95% CI: 1.37–5.51, $p=0.003$]) and the *NLRP1* A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16–0.87, $p=0.023$]) was associated with protection against infectious comorbidities. It was not found association between *NLRP3* and *P2RX7* polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia in our study. Our results suggest that the inflammasome single-variant polymorphisms (SNVs) may play a role in the development and prognostic of childhood leukemia. However, this finds requires further study within a larger population in order to prove it.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematopoietic neoplasm characterized by the exacerbated proliferation of blasts in bone marrow and affects mainly children aged 2 to 15 years old. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), it is estimated that for each year of the 2020–2022 triennium, there will be 5920 new cases of leukemia (Acute and chronic) in men and 4860 in women in Brazil, which corresponds to an estimated risk of 5.67 new cases per 100 thousand men and 4.56 for each 100 thousand women^{1,2}.

Due to its unknown etiology, studies associate the manifestation of ALL with the interaction of genetic and environmental factors, however, less than 10% of cases are attributed to heredity^{3,4}. New evidence indicates that inflammation plays an important role in all stages of cancer development. Since inflammation promotes the accumulation of genetic alterations that can inhibit the cell death control pathways of hematopoietic progenitor stem cells (HSPCs) and contribute to the generation of pre-leukemic clones. Mel Greaves observed that a

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. ²Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM 69050-001, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. ⁴Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brazil. ⁵Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brazil. ⁶Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. ⁷Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil. ⁸Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. ✉email: allyson.gui.costa@gmail.com

Anexo VIII. Translating Unconventional T Cells and Their Roles in Leukemia Antitumor Immunity (doi: 10.1155/2021/6633824).

Hindawi
Journal of Immunology Research
Volume 2021, Article ID 6633824, 15 pages
<https://doi.org/10.1155/2021/6633824>



Review Article

Translating Unconventional T Cells and Their Roles in Leukemia Antitumor Immunity

Nilberto Dias de Araújo,^{1,2} Fábio Magalhães Gama,^{1,2} Mateus de Souza Barros,^{1,2}
Thaís Lohana Pereira Ribeiro,² Fabíola Silva Alves,^{2,3} Lilyane Amorim Xabregas,^{2,3}
Andréa Monteiro Tarragó,^{1,2,3} Adriana Malheiro,^{1,2,3,4} and Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM 69067-005, Brazil

²Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM 69050-001, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM 69850-000, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM 69850-000, Brazil

⁵Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM 69040-000, Brazil

Correspondence should be addressed to Allyson Guimarães Costa; allyson.gui.costa@gmail.com

Received 7 November 2020; Revised 16 December 2020; Accepted 23 December 2020; Published 7 January 2021

Academic Editor: Xue-Li Zhang

Copyright © 2021 Nilberto Dias de Araújo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Recently, cell-mediated immune response in malignant neoplasms has become the focus in immunotherapy against cancer. However, in leukemia, most studies on the cytotoxic potential of T cells have concentrated only on T cells that recognize peptide antigens (Ag) presented by polymorphic molecules of the major histocompatibility complex (MHC). This ignores the great potential of unconventional T cell populations, which include gamma-delta T cells ($\gamma\delta$), natural killer T cells (NKT), and mucosal-associated invariant T cells (MAIT). Collectively, these T cell populations can recognize lipid antigens, specially modified peptides and small molecule metabolites, in addition to having several other advantages, which can provide more effective applications in cancer immunotherapy. In recent years, these cell populations have been associated with a repertoire of anti- or protumor responses and play important roles in the dynamics of solid tumors and hematological malignancies, thus, encouraging the development of new investigations in the area. This review focuses on the current knowledge regarding the role of unconventional T cell populations in the antitumor immune response in leukemia and discusses why further studies on the immunotherapeutic potential of these cells are needed.

1. Introduction

Leukemia comprises a heterogeneous group of hematological neoplasms, which can be classified into lymphoblastic or myeloid leukemias and divided into acute and chronic types, depending on the affected cell type, maturation stage, and blast count, respectively [1]. While acute leukemias are characterized by a deep block in hematopoietic differentiation and result in an overproduction of immature blasts, chronic

leukemias are characterized by the excessive production of partially mature differentiated cells, for example, lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and granulocytes in chronic myeloid leukemia (CML) [2, 3]. The hallmark of these neoplasms is the increase in leukemic cells (LCs) in the bone marrow (BM) and their release in the peripheral blood (PB) and in extramedullary sites [1].

The immunological mechanisms in patients with leukemia are not very well known. However, with the increasing

Anexo IX. Disrupted balance of chemokines and cytokines in bone marrow microenvironment of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia.

21/04/2021

Hindawi



Fábio ▾

[← BACK](#) [DASHBOARD / ARTICLE DETAILS](#)

Updated on 2021-02-24

Version 1 ▾

Disrupted balance of chemokines and cytokines in bone marrow microenvironment of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia

[SUBMIT REVISION](#)

ID 5530650

Fábio Gama¹, Marlon Kerr², Hiochelton Ibiapina³, Fabíola Alves⁴, Nilberto Araújo¹, Lilyane Xabregas⁵, Juliana Neves³, Eliana Alves⁶, Maria Carvalho⁶, Andréa Tarragó⁷, Olindo Martins-Filho⁸, Andréa Teixeira-Carvalho⁸, Adriana Malheiro⁹, Allyson Guimarães Costa SA CA¹⁰
[+ Show Affiliations](#)

Article Type

Research Article

Journal

Journal of Oncology

Special Issue

CLOSING DATE: 2021-06-17

Immune Response Modulation...

Lead Guest Editor

Reem Saleh

Guest Editor

Submitted on 2021-02-24 (2 months ago)

[> Abstract](#)
[> Author Declaration](#)
[> Files 2](#)
[+ Editorial Comments](#)
[+ Reviewer Reports](#)

2 submitted

Anexo X. Bone marrow soluble immunological mediators as clinical prognosis biomarkers in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients undergoing induction therapy.



Bone marrow soluble immunological mediators as clinical prognosis biomarkers in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia patients undergoing induction therapy

Marlon W. Kerr¹, Fábio Magalhães-Gama², Hiocelson N. Ibiapina¹, Fabiola S. Hanna², Lilyane A. Xabregas¹, Eliana B. Alves³, João P. Pimentel³, Maria P. Carvalho³, Andrea M. Tarrago³, Andréa Teixeira-Carvalho⁴, Olindo A. Martins Filho⁴, Allyson G. Costa^{2,3*}, Adriana Malheiro²

¹University of the State of Amazonas, Brazil, ²Federal University of Amazonas, Brazil, ³Department of Education and Research, Hospital Foundation of Hematology and Haemotherapy of Amazonas, Brazil, ⁴Integrated Research Group on Biomarkers, René Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Oncology

Specialty Section:
Cancer Immunity and Immunotherapy

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
696032

Received on:
16 Apr 2021

Journal website link:
www.frontiersin.org