

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Juliete Nathali Scholl

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DESEMPENHADO POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA NA MODULAÇÃO DO
SISTEMA IMUNE E NA PROGRESSÃO TUMORAL**

Porto Alegre

2019

Juliete Nathali Scholl

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DESEMPENHADO POR VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA NA MODULAÇÃO DO
SISTEMA IMUNE E NA PROGRESSÃO TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Scholl, Juliete Nathali
Avaliação do papel desempenhado por vesículas
extracelulares derivadas de glioblastoma na modulação
do sistema imune e na progressão tumoral / Juliete
Nathali Scholl. -- 2019.
103 f.
Orientador: Fabrício Figueiró.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Câncer. 2. Glioblastoma. 3. Vesículas
extracelulares. 4. Sinalização Purinérgica. I.
Figueiró, Fabrício, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Não só nesses dois últimos anos, mas como em toda a minha vida, meus pais, Marcos e Seloní, sempre fizeram de tudo para eu ter uma vida completa e confortável. São meus alicerces, sem os quais eu não poderia me firmar. Obrigada por todo apoio sempre;

Ao meu orientador, Dr. Fabrício, por toda atenção, paciência e ensinamentos nesses últimos dois anos;

À professora Ana Battastini, por me acolher no laboratório 22;

A todos do laboratório 22, a convivência com vocês tornou tudo mais fácil. À Amanda e a Dani, por me mostrarem como tudo funcionava no laboratório. À Pauline, por toda ajuda nesse último ano, tu é ótima. Em especial à Roberta, por todo apoio, amizade e carinho em todos momentos, sem ti esses dois anos seriam muito mais difíceis;

A todos os meus amigos, que tornaram os dias mais leves e encheram meu coração, por toda paciência durante esse período, sei que muitas vezes faltei com vocês. Em especial a minha melhor amiga, Fernanda, por me entender tão bem nesses últimos 19 anos e ao Samuel, pelos almoços, jantas e abraços;

Agradeço aos componentes da banca pela disponibilidade na avaliação desse trabalho;

Aos funcionários do departamento, em especial a Ana Carolina, por todo auxílio desde o início, Giordano e Cléia por todas as soluções de problemas na secretaria;

Por fim, agradeço ao apoio financeiro das instituições CAPES e CNPq.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação

Simone de Beauvoir

SUMÁRIO

PARTE I	
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central	11
1.2 Glioblastoma	12
1.3 Microambiente tumoral	14
1.4 Vesículas Extracelulares	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
PARTE II	20
3 RESULTADOS	21
3.1 CAPÍTULO I	21
3.2 CAPÍTULO II	47
PARTE III	81
4 DISCUSSÃO	82
5 CONCLUSÃO	91
6 PERSPECTIVAS	92
7 REFERÊNCIAS	93
ANEXO A: Carta de aprovação do CEUA	102
ANEXO B: Colaborações (Artigos publicados no período do mestrado)	103

PARTE I

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o mais maligno e com a menor taxa de sobrevivência dos tumores gliais. O tecido tumoral é composto por muitas células neoplásicas em proliferação, fibroblastos e células do sistema imune. A proliferação tumoral depende de uma rede complexa de fatores, como citocinas, adenosina e vesículas extracelulares (VEs). O papel das VEs ainda é um assunto controverso e sua atividade pró-tumoral ou antitumoral não é totalmente compreendida. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi compreender o papel das vesículas extracelulares derivadas de tumores (VETs), derivadas da linhagem celular C6, na modulação do sistema imune e na progressão do GBM. VETs foram isolados por centrifugação diferencial do sobrenadante da linhagem celular C6. O tamanho e a polidispersão foram analisados por equipamentos Nanosight, ZetaSizer e Microscopia Eletrônica de Transmissão. A estabilidade das VETs foi analisada pelo equipamento ZetaSizer nos dias 1, 4 e 18. Estas vesículas foram caracterizadas pela presença de marcador clássico, como CD9, e também pela presença das enzimas CD39 e CD73. Além disso, as células de GBM C6 foram tratadas com diferentes concentrações de VETs durante 96 h (n = 3) e a viabilidade celular foi avaliada por ensaio MTS. Em seguida, as VETs foram incubadas (8 µg) com linfócitos mesentéricos isolados de ratos Wistar adultos. Após 48 h de incubação, a expressão das enzimas CD39 e CD73 nos linfócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Os modelos GBM *in vivo* foram realizados com três grupos de ratos Wistar machos adultos: Controle, coinjeção e imunização. No grupo de coinjeção, as VETs foram coinjectadas com células C6 GBM no estriado por cirurgia estereotáxica. No grupo de imunização, os ratos foram tratados com 20 µg de VETs 10 e 5 dias antes da cirurgia. Após 14 dias de crescimento tumoral, os ratos foram decapitados e o cérebro foi removido para quantificação do volume do tumor e análise do microambiente tumoral. As VETs apresentaram tamanho uniforme ($175,2 \pm 6,14\text{nm}$) e a estabilidade, a 4 ° C, durante os 18 dias testados. Os inibidores das enzimas CD39 e CD73 reduziram (52,1% e 57,8%, respectivamente) a formação de ADO, enquanto o efeito do bloqueio do receptor ADO não alterou a concentração deste nucleosídeo. A porcentagem de células viáveis foi significativamente reduzida após o tratamento com 16 e 32 µg / mL de VETs (de $120 \pm 2,12\%$ para $82,52 \pm 5\%$ e $92,1 \pm 7,9\%$, respectivamente). A incubação de linfócitos T com VETs não alterou a expressão da proteína CD39 e CD73 em nenhum dos subtipos testado de linfócitos T. Além disso, a coinjeção de VETs reduziu o tamanho do GBM de $221 \pm 65,1 \text{ mm}^3$ para $121 \pm 40,6 \text{ mm}^3$ em comparação ao controle. O grupo imunização apresentou um menor volume de GBM em comparação ao grupo controle (de $173 \pm 91,8 \text{ mm}^3$ para $69 \pm 20,2 \text{ mm}^3$). Buscando entender o mecanismo por trás dessa redução, analisamos a presença de células CD4⁺FOXP3⁻ e CD4⁺FOXP3⁺ no microambiente tumoral. O grupo coinjeção mostrou uma redução significativa de células CD4⁺FOXP3⁻ e CD4⁺FOXP3⁺, no entanto, não observamos o mesmo no grupo de imunização, que não mostrou diferença entre os grupos. Juntos, nossos resultados sugerem que os VETs desempenham um papel antitumoral na progressão do GBM, reduzindo a proliferação tumoral e a presença de linfócitos T regulatórios no microambiente tumoral.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most malignant with the poorest survival rate of the glial tumors. The tumoral tissue is composed by many proliferating neoplastic cells, fibroblasts and cells of immune system. Tumor proliferation depends on complex network factors, such as cytokines, adenosine and extracellular vesicles (EVs). The role of EVs remains controversial and their pro-tumoral or antitumoral activity is not fully understood. In this context, the aim of this study was to understand the role of tumor-derived extracellular vesicles (TEVs) in the immune system modulation and GBM progression. TEVs were isolated by differential centrifugation of C6 cell line supernatant. Size and polydispersity were analyzed by Nanosight, Zetasizer equipments and Transmission Electron Microscopy. TEVs stability was analyzed by Zetasizer equipment on days 1, 4 and 18. These vesicles were characterized by the presence of EVs classical marker, CD9, also CD39 and CD73 enzymes. Further, C6 GBM cells were treated with different concentrations of TEVs during 96 h (n=3) and cell viability was assessed by MTS assay. Then, TEVs were incubated (8 µg) with mesenteric lymphocytes isolated from adult Wistar rats. After 48 h of incubation, the expression of CD39 and CD73 enzymes was evaluated by flow cytometry. The *in vivo* GBM model was performed with three adult male Wistar rats groups: Control, coinjection and immunization. In the coinjection group, TEVs were coinjecting with C6 GBM cells into the striatum by stereotactic surgery of adult Wistar rats. In the immunization group, rats were treated with 20 µg of TEVs 10 and 5 days before surgery. After 14 days of tumor growth, the rats were decapitated and the entire brain was removed for tumor size quantification and tumor microenvironment analysis. TEVs presented uniform size (175,2±6,14nm) and the stability, at 4°C, during the 18 days tested (186,8±6,64nm). Inhibitors of CD39 and CD73 enzymes reduces (52,1% and 57,8%, respectively) formation of ADO while the effect of ADO receptor blockade did not alter the concentration of this nucleoside. The percentage of viable cells was significantly reduced after treatment with 16 and 32 µg/mL of TEVs (from 120±2,12% to 82,52±5% and 92,1±7,9%, respectively). The incubation of T-lymphocytes with TEVs did not alter the expression of CD39 and CD73 protein in any tested subset of T-lymphocytes. Moreover, the co-injection of TEVs reduces the GBM size from 221 ± 65,1 mm³ to 121± 40,6 mm³ in comparison to GBM group. Immunization group reduces the GBM size from 173 ± 91,8 mm³ to 69 ± 20,2 mm³. Seeking to understand the mechanism behind this reduction, we analyzed the presence of CD4⁺FOXP3⁻ and CD4⁺FOXP3⁺ cells in tumor microenvironment. The coinjection group showed a significant reduction of CD4⁺FOXP3⁻ and CD4⁺FOXP3⁺ cells, however we didn't observe the same in immunization group, which has shown no difference between groups. Together, our results suggest TEVs plays an anti-tumoral role in GBM progression by reducing tumor proliferation and presence of T regulatory lymphocytes in tumor microenvironment.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO: Adenosina

Breg: Linfócitos B regulatórios

CD: Células Dendríticas

EXOs: Exossomos

GBM: Glioblastoma

HE: Hematoxilina e eosina

IDH: Isocitrato desidrogenase

ISEV: *International Society of Extracellular Vesicles*

MVs: Microvesículas

NK: *Natural Killer*

OMS: Organização Mundial da Saúde

SNC: Sistema Nervoso Central

Teff: Linfócitos T efetores

Treg: Linfócitos T regulatórios

VEs: Vesículas Extracelulares

VETs: Vesículas Extracelulares derivadas de Tumores

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) correspondem a um amplo grupo, altamente heterogêneo, de doenças que apresentam características clínicas, biológicas e histológicas variadas e correspondem a 2% de todos os tumores malignos do mundo (Ferreira e Rocha, 2004). Em 2018, de acordo com o projeto Globocan, os tumores do SNC apresentaram uma incidência, em nível mundial, de 296.851 novos casos e 241.037 mortes (Ferlay et al., 2018). A classificação dos tumores do SNC amplamente adotada é organizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Nas últimas décadas, a classificação se baseou basicamente em conceitos de histogênese, ou seja, de acordo com características celulares microscópicas e seus níveis de diferenciação, auxiliados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) na coloração dessas células e imunohistoquímica. Recentemente, tornou-se claro que essa divisão seria muito simplória dada a complexidade histológica e genética dos tumores. Frente a isso, em 2016, a OMS incorporou parâmetros moleculares na classificação dos tumores do SNC. Com essa mudança, busca-se um diagnóstico e prognóstico mais preciso, bem como um melhor direcionamento para o tratamento (Louis et al., 2016).

Previamente, a OMS agrupava os tumores do SNC nas seguintes categorias: tumores do tecido neuroepitelial, tumores dos nervos cranianos e paraespinais, tumores das meninges, linfomas e neoplasias hematopoiéticas, tumores de células germinativas, tumores da região selar e tumores metastáticos (Louis et al., 2007). A categoria dos tumores do tecido neuroepitelial é composta pelos tumores astrocíticos, também conhecidos como gliomas, os quais compreendem uma variedade de neoplasias que diferem pela sua localização no SNC, idade, sexo, extensão, potencial invasivo, características morfológicas e progressão do curso clínico (Kleihues e Cavenee, 1997). Atualmente, a combinação de características moleculares

e histológicas na classificação dos tumores gerou a necessidade de padronizar a nomenclatura utilizada, a qual passou a consistir da classificação histopatológica seguida pela característica genética.

Os gliomas são os tumores do SNC mais comuns em adultos, originam-se de uma célula glial ou células precursoras e representam, pelo menos, 80% dos tumores cerebrais. Apresentam uma incidência de 3 - 5 por 100.000 pessoas por ano, podendo ocorrer em todas as faixas etárias, sendo mais prevalente em adultos maiores de 45 anos de idade. Os gliomas apresentam características morfológicas e de expressão gênica semelhantes às células gliais. Histologicamente, eles são diferenciados como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e oligoastrocitomas (Furnari et al., 2007; Porter et al., 2010; Preusser, Ribaupierre, & Wo, 2011; Schwartzbaum et al., 2006). Além disso, os gliomas podem ser classificados em tumores de grau I, II, III e IV utilizando critérios estabelecidos pela OMS 2007 (Louis et al., 2007). Os tumores de grau IV, também conhecidos como glioblastoma (GBM), apresentam características mais avançadas de malignidade, incluindo proliferação vascular e necrose, muitas vezes refratárias à radioterapia ou quimioterapia (Cheng et al., 2011; Louis et al., 2007). Na atual classificação da OMS, o GBM foi subdividido em 3 subtipos: GBM, Isocitrato desidrogenase (IDH)-wild type (GBM primário); GBM, IDH-mutante (GBM secundário); e GBM não especificado (IDH não avaliado) (Louis et al., 2016).

1.2 Glioblastoma

O GBM é o mais maligno dos tumores gliais, está associado a uma baixa sobrevida e é caracterizado por grande heterogeneidade genética, morfológica e histológica intratumoral, a qual é composta por muitas células neoplásicas em proliferação, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos (Balkwill, 2004; Solinas

et al., 2009). Além disso, o GBM é caracterizado por proliferação celular incontrolada, infiltração difusa, tendência à necrose, angiogênese significativa, resistência a apoptose e diversas alterações genômicas (Furnari et al., 2007; Kesari, 2011; Louis et al., 2007). O GBM pode se manifestar em qualquer idade, mas sua maior incidência encontra-se entre 45 a 85 anos de idade (Nakamura et al., 2007). Estudos realizados pelo CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*), durante o período de 2008 a 2012, concluíram que o GBM é o segundo tumor primário cerebral mais frequente e o tumor cerebral maligno mais frequente nos Estados Unidos da América (EUA), contribuindo para 15,1% de todos os tumores primários do cérebro e 46,1% dos tumores malignos do cérebro.

O GBM é considerado incurável, com uma expectativa de vida média de 15 meses após o diagnóstico, usando o padrão atual de tratamento, composto de cirurgia de ressecção, radioterapia e quimioterapia. Apesar disso, apenas 3 - 5% dos pacientes sobrevivem 3 ou mais anos, o tratamento continua paliativo para a maioria dos pacientes e a cura se mantém incerta. Os fatores relacionados a essa baixa sobrevida são a barreira hematoencefálica, que limita a entrada de fármacos no SNC, restringindo a terapia e favorecendo o desenvolvimento de resistência (Soffietti, Leoncini, & Rudà, 2007), ao microambiente tumoral e seu um sistema imune deficiente que além de não combater o crescimento neoplásico, pode auxiliar no desenvolvimento tumoral, bem como ao fato do GBM ser um tumor heterogêneo e com alta probabilidade de recidiva. A recorrente recidiva está amplamente relacionada a capacidade infiltrativa e proliferativa desse tumor, impedindo a extinção das células tumorais e células tronco tumorais. Por esses motivos, o GBM apresenta, em geral, um curso rápido e agressivo (Stupp et al., 2009). É importante ressaltar que a proliferação tumoral é dependente de uma rede complexa de fatores, entre eles citocinas, quimiocinas e adenosina, as quais culminam em imunossupressão no microambiente tumoral, orquestrada por células regulatórias, as quais

estão diretamente relacionadas com pior prognóstico em pacientes com GBM (Sayour et al., 2015).

1.3 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral representa todas as células tumorais e não-tumorais presentes no tumor, incluindo células do sistema imune como microglia, macrófagos, linfócitos, além de astrócitos, células tronco, fibroblastos, células endoteliais, e uma variedade de moléculas produzidas por essas células que influenciam a progressão tumoral (Schiffer et al., 2018). Já é amplamente conhecido que tumores possuem um infiltrado inflamatório. Apesar desse infiltrado de células inflamatórias variar em tamanho e composição dependendo do tumor, sua presença é uma evidência que apesar do desenvolvimento do tumor pelo organismo, esse busca interferir na progressão tumoral, processo conhecido como vigilância imune. Esse infiltrado está diretamente relacionado com o grau de malignidade do tumor e é sugerido que a presença de linfócitos, macrófagos e microglia no microambiente tumoral é componente indispensável nos processos de proliferação, migração, angiogênese e sobrevivência tumoral (Nieto-Sampedro et al., 2011; Sayour et al., 2015; Watters, Schartner, & Badie, 2005). Nesse âmbito, a modulação do microambiente tumoral pelas células neoplásicas leva a uma série de eventos, como imunossupressão e vascularização, que influenciam a progressão tumoral.

As células imunes presentes no microambiente tumoral incluem as mediadoras da imunidade adaptativa, como linfócitos T e B e células dendríticas, e as efetoras da imunidade inata, como macrófagos e células Natural Killer (NK) (Ferrone & Whiteside, 2007). Os linfócitos T podem ser divididos em linfócito T auxiliar ($CD3^+CD4^+$), T-citotóxico ($CD3^+CD8^+$) e T-regulatório ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$). Os linfócitos T regulatórios (Treg) são fenotipicamente classificados como $CD4^+CD25^{high}CD39^+FOXP3^+$ e controlam a renovação

celular no timo, regulando a expansão linfocítica, inflamação crônica e processos autoimunes. No câncer, em contrapartida, as células Treg contribuem para um ambiente imunossuprimido e favorecem o desenvolvimento neoplásico, inibindo a ativação de linfócitos T efetores (Teff) e células NK tanto por contato dependente quanto pela liberação de IL-10 e TGF- β (Bastid et al., 2013; Borsellino et al., 2016). Recentemente, também tem sido demonstrada a capacidade de linfócitos B em suprimir células imunes, sugerindo então a denominação linfócitos B regulatórios (Breg) (Rosser & Mauri, 2015). Dessa forma, sabe-se que linfócitos B podem tanto suprimir quanto estimular a resposta efetora do sistema imune, gerando assim resposta anti- ou pró-tumoral, dependendo do sinal recebido (Saze et al., 2013).

Assim, as células inflamatórias presentes no microambiente tumoral podem tanto contribuir para a progressão tumoral quanto podem impedir o desenvolvimento neoplásico. O tumor não só possui mecanismos de evasão imune, mas também é capaz de modificar funções do infiltrado inflamatório para criar um microambiente que favoreça a progressão tumoral. Isso é possível devido a capacidade dos tumores de subverter ativamente a imunidade antitumoral por uma variedade de mecanismos, tais como o acúmulo de células Treg capazes de suprimir a imunidade antitumoral, ambiente de hipóxia, via NF- κ B que promove liberação de citocinas, entre outros (Denko et al., 2003; T. L. Whiteside, 2013). Gliomas malignos promovem uma série de mecanismos imunomodulatórios que podem resultar na supressão do sistema imune. Nesse contexto, por exemplo, a atividade constitutiva de NF- κ B em células cancerígenas está relacionada com a expressão de genes de resistência a apoptose (BCL-xL e survivina), além de marcadores de inflamação (IL1- β , IL-6, COX2). A hipóxia é um potente estimulador de angiogênese e induz produção de citocinas (Nogueira et al., 2011). Células supressoras como, por exemplo, linfócitos Treg podem ser tanto recrutados dos tecidos linfoides (Treg naturais) como podem ser diferenciados de linfócitos T virgens (Treg induzidos) no microambiente dos gliomas (Sayour et al., 2015; Whiteside, 2015).

Estudos recentes mostram que Treg e Breg são capazes de produzir AMP e adenosina, pela presença das enzimas NTPDase1/CD39 e ecto-5'-nucleotidase/CD73 presentes na membrana plasmática, as quais foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos Teff (Figueiró et al., 2016; Saze et al., 2013). Essas enzimas estão envolvidas na sinalização purinérgica, responsável por hidrolisar o ATP extracelular até adenosina, uma molécula imunossupressora. O sistema purinérgico é composto por nucleotídeos (como ATP) e por nucleosídeos (como adenosina) que, em geral, têm funções opostas em neoplasias sólidas. O ATP, através da ligação aos seus receptores P2, principalmente o P2X7, pode funcionar como molécula quimiotática para células imunes, além de ser potencialmente tóxico para células neoplásicas (Stagg & Smyth, 2010). Por outro lado, adenosina é descrita como molécula imunossupressora, facilitando o escape dos tumores ao sistema imune através da ligação aos receptores P1, principalmente receptor A2A (Antonioli et al., 2013). No microambiente tumoral, linfócitos regulatórios, que superexpressam a enzima NTPDase1/CD39 (Mandapathil et al., 2009) coordenadamente com células de GBM, que superexpressam ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Bavaresco et al., 2008), produzem adenosina pela hidrólise sequencial do ATP extracelular, a qual favorece um ambiente imunossuprimido e pró-tumoral (Xu et al., 2013).

1.4 Vesículas Extracelulares

A comunicação entre células cancerosas e não cancerosas desempenha um papel essencial durante o processo de progressão tumoral e modulação do microambiente tumoral. Whiteside et al (2011) descreveu três principais mecanismos utilizados pelos tumores no escape do sistema imune: acúmulo de células Treg expressando ectonucleotidases, expressão de receptores toll-like e presença de vesículas extracelulares derivadas de tumores. As vesículas

extracelulares (VEs) podem ser divididas em três categorias: exossomos (EXOs), microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos. Todas VEs apresentam uma bicamada lipídica; contudo, variam em tamanho, conteúdo e atividade biológica, desde comunicação intercelular (EXOs e MVs) até a renovação celular (corpos apoptóticos) (Kalra, Drummen, & Mathivanan, 2016).

EXOs são pequenas partículas (30 - 150 nm) liberadas por uma variedade de células, como tumorais, embrionárias, dendríticas, macrófagos e células B, T e NK (Anand, 2010; Colombo, Raposo & Théry, 2014; Xie et al., 2010; Zumaquero et al., 2010). Eles se originam do compartimento endossomal das células, em uma fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática (Colombo, Raposo & Théry, 2014; Schorey & Bhatnagar, 2008; Trams et al., 1981). As MVs, por outro lado, são partículas maiores (100 - 1000 nm) que se originam por exocitose por meio da membrana plasmática (Muralidharan-Chari et al., 2009). Por esse motivo, essas vesículas, especialmente os EXOs, são muito semelhantes às células que as originaram em termos de conteúdo de proteína, além de expressarem uma série de antígenos tumorais quando secretados por células cancerígenas (Parolini et al., 2009). Além disso, essas vesículas possuem um importante papel na comunicação intercelular com funções autócrinas e parácrinas, mediando a regulação e ativação da resposta imune (Montecalvo et al., 2019). Por exemplo, VEs originadas de células T ativadas podem mediar a morte celular induzida por ativação, ao passo que VEs derivados de tumores podem imunizar contra o desafio tumoral, por meio da ativação de um sistema imune antitumoral (Bu et al., 2015; Harshyne et al., 2015) ou inibir o sistema imune pela formação de citocinas e adenosina, criando um ambiente pró-tumoral (Clayton et al., 2011; Liu, Wang, & Yuan, 2013).

Devido a essas características, os VEs derivados de tumores são sistemas eficientes para a transferência *in vivo* de sinais “cross-talk”, apresentando múltiplas moléculas bioativas associadas que sugerem que eles apresentem um papel central na geração e modulação do

microambiente tumoral (Marhaba et al., 2008; Park et al., 2010) e amplamente discutido na revisão presente na Parte II a seguir. No entanto, apesar de estudos pré-clínicos e mesmo clínicos demonstrarem a capacidade de VEs em modular o sistema imune, é desconhecido até o momento se a modulação das células efectoras antitumorais é por uma ação direta ou pela modulação de linfócitos Treg. Além disso, devido ao fato dessas vesículas conterem antígenos tumorais e moléculas coestimulatórias, já foi mostrado que essas vesículas podem apresentar uma atividade anti-tumoral. Portanto, ainda é limitado o conhecimento sobre as consequências da interação entre sistema purinérgico, VEs e linfócitos regulatórios no microambiente tumoral e, conseqüentemente, na progressão do GBM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Entender o papel das VEs derivadas de células de GBM na modulação do sistema imune e na progressão tumoral.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as VETs quanto a expressão das proteínas CD9, CD39 e CD73;
- Avaliar a ativação de linfócitos T periféricos de ratos após a incubação com VETs através dos marcadores CD4, CD8, CD39 e CD73;
- Avaliar a influência das VETs na progressão de GBM implantado em ratos;
- Avaliar a influência das VETs na modulação do microambiente tumoral de GBM implantado em ratos.

PARTE II

3 RESULTADOS

Os resultados estão descritos em dois capítulos, os quais correspondem a uma revisão e um artigo original a serem submetidos para publicação (Capítulo I e II).

3.1 CAPÍTULO I

Extracellular vesicles in cancer progression: are they part of the problem or part of the solution?

Juliete N. Scholl, Laurent Muller, Ana M. O. Battastini, Fabrício Figueiró

Periódico: **OncoImmunology**

Status: **Manuscrito a ser submetido à publicação**

3.2 CAPÍTULO II

Tumor-Derived Extracellular Vesicles modulate the glioblastoma microenvironment and growth

Juliete N. Scholl, Amanda F. Dias, Pauline Pizzato, Daniela V. Lopes, Cesar E. J. Moritz,
Elisa H. F. Jandrey, Gabriele D. Souto, Mariana Colombo, Francieli Rohden, Jean Sévigny,
Silvia Guterres, Ana M. O. Battastini, Fabrício Figueiró

Periódico: **Journal of Extracellular Vesicles**

Status: **Manuscrito a ser submetido à publicação**

PARTE III

4 DISCUSSÃO

Gliomas malignos representam um dos maiores desafios no manejo dos pacientes com câncer em todo o mundo. Os tumores cerebrais primários são uma das neoplasias mais refratárias e sua forma mais agressiva, o GBM, também é o subtipo mais comum e letal. Apesar de recentes e notáveis descobertas feitas em oncologia, usando técnicas de neuroimagem na ressecção cirúrgica, juntamente com quimioterapia e radioterapia, a sobrevida dos pacientes atinge em média somente 15 meses a partir do momento do diagnóstico (Stupp et al., 2009).

O prognóstico desfavorável dessa doença está associado ao potencial invasivo e proliferativo que esse tumor possui, além da vasta heterogeneidade intratumoral presente. O microambiente tumoral e sua interação com o sistema imune são cruciais para a progressão da doença. Nesse aspecto, vesículas extracelulares derivadas de tumores (VETs) desempenham um importante papel na comunicação intercelular, capazes de modular o microambiente tumoral e interagir com o sistema imune; contudo, seu papel pró-tumoral ou antitumoral na progressão do tumor ainda é uma questão controversa devido a multiplicidade de trabalhos presentes na literatura com desfechos diferentes (Bu et al., 2015; Clayton et al., 2011). Nesse contexto, o presente estudo propõe um protocolo para isolar VEs e demonstra que essas VEs derivadas da linhagem celular C6 de GBM são capazes de diminuir o crescimento de GBM tanto *in vitro* quanto *in vivo*, promovendo uma mudança no microambiente tumoral.

Até o presente momento, não há um método padrão de isolamento, detecção e caracterização de VEs. Isso é devido, possivelmente, ao fato que as VEs são partículas nanométricas difíceis de serem isoladas e detectadas. Já existem várias técnicas para o isolamento de VEs de diferentes fontes biológicas, como plasma, urina e sobrenadante de cultura celular com protocolos baseados em centrifugações diferenciais (com ou sem gradientes de densidade), cromatografia por exclusão de tamanho, ultrafiltração, kits (Exo-quick), entre

outros (Théry et al., 2006). Em geral, são utilizadas mais de uma dessas técnicas no mesmo protocolo, na busca de um isolado mais puro. Como grande parte das pesquisas nessa área, utilizamos um protocolo baseado em ultracentrifugação para o isolamento das vesículas obtidas a partir do sobrenadante de cultura celular. Nesse contexto, um protocolo baseado unicamente em centrifugações diferenciais já é considerado um método efetivo na obtenção de VEs homogêneas, principalmente quando originado de amostras menos complexas, como sobrenadantes de cultura, além de ser um protocolo de baixo custo. Por outro lado, esse é um protocolo extenso que não permite o processamento de diversas amostras concomitantemente devido a limitação dos rotores utilizados nas ultracentrífugas, além de necessitar grande volume inicial das amostras.

Como comentado previamente, ainda não há uma padronização para o isolamento de VEs. Do ponto de vista prático, isolar e classificar apropriadamente essas vesículas é primordial para a obtenção de isolados homogêneos e com alta pureza. A falta de padronização pode acarretar interpretações de resultados equivocados, principalmente em VEs isoladas de fluidos corpóreos, como sangue e urina, uma vez que essas fontes apresentam propriedades químicas e físicas muito distintas umas das outras. Em busca de um protocolo apropriado, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), desde 2014, fornece os requisitos experimentais mínimos para o isolamento e caracterização das VEs, como formas de isolamento e caracterização. Em nosso estudo, dentre todas as variações testadas, o tempo de descongelamento se demonstrou um passo decisivo na técnica final, em que um descongelamento mais rápido, seguido por um ciclo de centrifugação, resultou em partículas menores e com uma boa concentração de proteína (tabelas I e II). O mesmo foi observado por Trummer e colaboradores (2009), em que as amostras descongeladas em gelo apresentaram significativa perda de VEs e mudança na expressão de antígenos quando comparadas a amostras

não congeladas e descongeladas a 37°C e 25°C. Essa diferença relativa ao descongelamento no gelo pode estar relacionada com a instabilidade e tendência a agregação das VEs.

Relativo às principais propriedades analisadas na caracterização das VEs, estão tamanho, número e conteúdo. Em relação ao tamanho, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é considerado o método padrão para a visualização de partículas nanométricas, como as VEs, provendo uma indicação da morfologia vesicular e revelando a presença de partículas não-vesiculares; contudo, é um método incapaz de mensurar a contaminação da amostra com fatores solúveis, como proteínas (Chuo, Chien, & Lai, 2018). Para estabelecermos o melhor método de isolamento das VEs, também foram avaliados fatores como tamanho e polidispersão das amostras por meio dos equipamentos ZetaSizer e Nanosight. Na figura 1, poderemos observar que os resultados obtidos pelo ZetaSizer são uma combinação de todas as partículas presentes no isolado em uma distribuição monomodal. Considerando que o isolado é uma suspensão de diferentes partículas com distintos tamanhos, o perfil das VEs é amplamente influenciado por partículas maiores, uma vez elas dispersam e espalham mais luz. Dessa forma, por meio do ZetaSizer nós podemos observar uma variabilidade maior entre diferentes análises, já que as subpopulações presentes na amostra podem variar entre os isolamentos (Chu, 2007). O equipamento Nanosight, por outro lado, é capaz de separar diferentes subpopulações, resultando em uma distribuição bimodal, sendo um método mais sensível e o mais utilizado entre pesquisadores para análise de VEs (Vestad et al., 2017). A tabela III apresenta a reprodutibilidade e polidispersão pelos índices D10, D50 e D90, os quais indicam a porcentagem das partículas abaixo desse índice em termos de tamanho. Dessa forma, como mostrado nas figuras 1A e 1B, as VEs apresentam tamanhos menores que 200 nm. EXOs, um dos subtipos de VEs existentes, apresentam tamanhos de 30 – 150 nm, portanto nossa amostra não é composta apenas por EXOs, apresentando partículas maiores. Entretanto, segundo a tabela III, cerca de 50% das VEs são menores que 150 nm, caracterizando nossa

amostra como enriquecida por EXOs. Por fim, as imagens obtidas por MET, demonstram que as VEs foram isoladas com sucesso, apresentam a morfologia clássica e de forma homogênea. Em relação às imagens obtidas pela MET, a morfologia clássica (“*cup-shaped*”) das vesículas observadas por meio dessa técnica é devido ao processo convencional de preparação da amostra para a MET, na qual as VEs são desidratadas, colapsando. O uso de outras técnicas para observação dessas VEs, como a microscopia crioeletrônica, permite a observação de vesículas arredondadas.

A estabilidade das VEs também foi avaliada, observou-se que elas se mantêm estáveis em termos de tamanho por pelo menos 18 dias quando armazenadas a 4°C. Já há na literatura dados relativos a como o método de armazenamento pode afetar o rendimento, composição e função das VEs (Ge et al., 2014; Welch et al., 2017; Zhou et al., 2006). Kalra et al. (2013) analisou por MET VEs derivadas de plasma humano armazenadas a 37°C, 4°C, -20°C e -80°C por 30 e 90 dias e os melhores resultados obtidos foram a baixas temperaturas (Kalra et al., 2013). Em contrapartida, não há tanta informação relacionada ao armazenamento e estabilidade de VEs derivadas sobrenadante de cultura celular. A ISEV recomenda que as VEs sejam armazenadas a -80°C em PBS (Witwer et al., 2017). Capricor Therapeutics, em um processo de patente, demonstrou que o tamanho e concentração das VEs se mantêm estáveis após uma semana de armazenamento a 4°C, -20°C e -80°C; contudo, os níveis de miRNA diminuem durante esse período quando armazenadas a 4°C e -20°C (Kreke et al., 2015). Em geral, esses dados concordam que a melhor forma de armazenar as VEs é a -80°C; entretanto, considerando a perda de vesículas durante o processo de congelamento e descongelamento, para experimentos rápidos, o armazenamento a 4°C pode ser útil e efetivo, pelo menos para o sobrenadante derivado de cultura celular.

Como resultado da sua biogênese, VEs derivados de diferentes tipos celulares são enriquecidas de proteínas de membrana semelhantes à sua célula de origem. Alguns marcadores estão presentes na literatura para caracterizar EXOs em diferentes populações de VEs. Como alguns exemplos de marcadores, temos as tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas envolvidas na apresentação de antígenos (MHC I e II), além de outra variedade de proteínas (TSG101, Alix, anexina, HSP70) (Brinton, Sloane, Kester, & Kelly, 2015; Johnstone, 2006; Clotilde Théry, Zitvogel, & Amigorena, 2002; Trams et al., 1981). A composição proteica das VEs pode ser analisada por diversas técnicas, como proteômica, citometria de fluxo e Western Blot. Essa composição reflete o tipo de célula de origem e a origem endossomal, bem como sua função fisiológica (Niel et al., 2006). Após determinar o melhor método de isolamento das vesículas, nós demonstramos que nosso isolado é rico em VEs com a presença de um marcador clássico de EXOs, como a CD9. De acordo com a ExoCarta, esse marcador é o mais frequente em EXOs (Keerthikumar et al., 2016).

Ainda referente à caracterização, observamos que essas vesículas são capazes de converter o ATP em adenosina (ADO) (Figura 2B). A presença das enzimas CD39 e CD73, essenciais na conversão ATP-ADO, também foi confirmada por citometria de fluxo (Figura 2A), levando-nos acreditar que as VETs são, pelo menos em parte, responsáveis pela produção de ADO extracelular, como mostrado por outros pesquisadores (A. Clayton et al., 2011; Schuler et al., 2014). A principal fonte de ADO no microambiente é resultante do fato das células tumorais superexpressarem a enzima CD73, enquanto células T regulatórias (Treg) superexpressam a enzima CD39. ADO acumulada no microambiente promove crescimento tumoral, angiogênese e inibe respostas antitumorais por meio da supressão de células T efetoras (Teff) e ativação de funções supressoras de células Treg (Deaglio et al., 2007; Magis Mandapathil et al., 2010; Ohta et al., 2006). Dessa forma, o acúmulo de ADO pode induzir um papel pro-tumoral aos VETs, contribuindo para a imunossupressão do microambiente tumoral,

promovendo crescimento tumoral e evasão do sistema imune. Em contrapartida, nossos resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram o oposto. A ADO acumulada no microambiente tumoral pode ser convertida a inosina pela ação da adenosina deaminase (ADA) ou entrar nas células por meio de transportadores. Dessa forma, ADA também apresenta um importante papel na modulação imune, sendo de vital importância para a manutenção da proliferação de Teff (Climent et al., 2009), preservando atividades antitumorais. Ademais, Tregs não expressam CD26 (presente em linfócitos a qual ancora ADA) e, em pacientes com câncer, a expressão do complexo ADA/CD26 está diminuída, o que facilita o tumor a evasão do sistema imune (Magis Mandapathil et al., 2012). Já foi observado que ADA, bem como transportadores de nucleosídeos (em especial o ENT2), estão expressos em células C6 (Ohkubo, Nagata, & Nakahata, 2007; Sinclair et al., 2002), dessa forma, podemos acreditar que eles também estejam expressos nas vesículas derivadas dessas células, o que pode justificar, pelo menos em parte, o papel antitumoral das VEs observado em nosso estudo.

Devido ao fato das VEs interagirem e modularem os linfócitos, além de conter moléculas supressivas e estimulantes semelhantes a sua célula de origem, como antígenos associados ao tumor, características genômicas tumor-específicas, leva-nos a pensar que o fato imunogênico está muito mais associado com a atividade antitumoral observada em nossos resultados que a imunossupressão promovida pela ADO. Nossos resultados *in vitro* de viabilidade e *in vivo* mostram um grande potencial antitumoral relacionado às VEs, isso sugere que deve haver outros fatores vesiculares que contribuem na ativação da resposta imune antitumoral. Além disso, estudos já demonstraram que a função biológica, bem como o conteúdo das VEs são dependentes da origem da célula (W. Chen et al., 2014; Wieckowski & Whiteside, 2006). No campo da imunoterapia, a aplicação de VEs originalmente estava baseada em VEs derivadas de células dendríticas (DC), ricas em CD9, CD81 e MHC I e II, capazes de induzir resposta imune antitumoral (Delcayre, Shu, & Pecq, 2005). Já existem, entretanto, estudos

envolvendo VETs que, apesar da já conhecida atividade imunossupressora por meio da inibição da atividade de Teff, ativação da atividade supressiva de Treg e comprometida atividade das células NK (Clayton et al., 2007; Zhang et al., 2007), suportam que a resposta imune induzida pelas proteínas de choque térmico presentes nas VEs são capazes de promover ativação de células NK, lise do tumor pela liberação de granzima B e indução de resposta T citotóxica antígeno-específica (Dai et al., 2005; Khalil, Kabapy, Deraz, & Smith, 2011; Yufeng Xie et al., 2010).

Além disso, VETs são fontes de antígenos tumorais. Nosso estudo mostrou uma significativa redução do tumor após o tratamento com VETs e, adicionalmente, uma mudança do perfil do microambiente tumoral de pro-tumoral para anti-tumoral, com uma importante redução de células Treg imunossupressoras. Além do fato da redução de células Treg estar relacionado com a redução tumoral, o exato mecanismo por trás desse resultado ainda não é bem compreendido, entretanto, nós acreditamos que os VETs carregam materiais antigênicos e MHC, que são fundamentais no processo de apresentação de antígeno, promovendo uma forte atividade de células Teff e suprimindo Treg. Wolfers et al. (2001) acredita que VETs são uma via importante para a apresentação cruzada de antígenos devido a forma como ocorre a biogênese dessas vesículas, permitindo que elas sejam enriquecidas de moléculas (MHC, HSP70) e antígenos tumorais nativos capazes de desencadear uma resposta antitumoral (Wolfers et al., 2001). Já foi observado que VEs derivadas tanto de tumores quanto de CD são capazes de transferir antígenos para CD e desencadear uma efetiva ativação de células T *in vitro* e *in vivo*, levando a rejeição de tumores autólogos (Andre et al., 2002; Wolfers et al., 2001). Alguns estudos também relacionam o papel imunogênico de VETs com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL2 e IL18 (Dai et al., 2006; Yang et al., 2007), ativação de CD (Chen et al., 2011) e geração de linfócitos T citotóxicos específicos (Altieri et al., 2004). Tais estudos ajudam a suportar nossos achados, pelo menos os relativos ao modelo *in vivo*.

Nosso modelo de coinjeção de TEVs se mostrou mais efetivo no desencadeamento da resposta imunológica no microambiente tumoral em relação as células Treg, havendo uma significativa redução dessas células. Acreditamos que esse fato se deve, pelo menos em parte, ao fato das vesículas estarem sendo injetadas no momento do implante tumoral, o que pode influenciar desde o princípio toda dinâmica tumoral. Marabelle et al. (2013) demonstrou, ao depletar Tregs por meio de injeções intratumorais com imunomoduladores, uma diminuição do crescimento tumoral, bem como ausência de metástases (Marabelle et al., 2013). O pré-tratamento dos ratos com VETs também promoveu uma diminuição do tumor; contudo, não houve diferença em relação a células regulatórias. Como o pré-tratamento busca estimular o sistema imune previamente ao implante do tumor, acreditamos que o mecanismo por trás da redução do tumor no grupo dos animais pré-tratados esteja relacionado com células CD8⁺ de memória. Em relação a imunoterapia, a geração de células T de memória contra antígenos tumorais é fundamental e ocorre com auxílio de citocinas (IFN- α e IL12, por exemplo), as quais fornecem sinais que ativam as T CD8⁺, induzindo a um fenótipo de memória (Mescher et al., 2007).

Apesar de existirem estudos relatando a relação de VEs derivados de glioma (VEGs) com a imunossupressão do microambiente e consequente progressão tumoral, (Domenis et al., 2017; Hellwinkel et al., 2016; Iorgulescu et al., 2016), ainda há poucos estudos mostrando o efeito anti-tumoral de VEGs (Bronisz et al., 2014; Katakowski et al., 2013; Muller et al., 2015). Até presente momento, acreditamos que esse seja o primeiro estudo demonstrando que as VEs derivadas da linhagem C6 de rato seja capaz de suprimir o crescimento de GBM *in vivo* e modular o microambiente tumoral. Mostramos também que a forma de tratamento também influencia a resposta imunológica desencadeada, uma vez que o modelo de coinjeção, ao atuar mais localmente, reduziu células regulatórias, ao passo que o modelo de imunização não afetou essas células. Presumimos que essa resposta possa relacionada a formação de células CD8⁺ de

memória, induzindo a uma resposta imunológica tumor-específica. Além disso, dados preliminares do grupo, não mostrados no presente trabalho, mostraram que o tratamento após o implante tumoral não promoveu redução do tumor, tornando claro o papel das VEs em ativar uma resposta imunológica contra o tumor.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, propomos um protocolo para isolamento de vesículas extracelulares derivadas da linhagem C6 de GBM, além de caracterizá-las de acordo com a presença de marcadores como CD9, CD39 e CD73. Além disso, demonstramos que essas vesículas desempenham um papel antitumoral na progressão do GBM *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a proliferação tumoral e a presença de linfócitos T regulatórios no microambiente tumoral.

6 PERSPECTIVAS

- Realização da técnica de Western Blot para CD9, HSP70, CD39 e CD73;
- Realização de tratamento após o implante do tumor e posterior avaliação do tamanho e microambiente tumoral;
- Avaliação do microambiente tumoral em relação a células CD8⁺, NK, bem como a produção de citocinas;
- Isolar VEs provenientes do sangue periférico dos ratos submetidos às diferentes modalidades de tratamentos, buscando possíveis biomarcadores.

7 REFERÊNCIAS

- Anand, P. K. (2010). Exosomal membrane molecules are potent immune response modulators. *Communicative and Integrative Biology*, 3(5), 405–408. <https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12474>
- Andre, F., Scharz, N. E. C., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., ... Zitvogel, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet*, 360, 295–305.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 842–857. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>
- Balkwill, F. (2004). CANCER AND THE CHEMOKINE NETWORK. *Nature Reviews*, 4, 540–550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>
- Bastid, J., Cottalorda-Regairaz, A., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J. F., & Bensussan, A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*, 32(14), 1743–1751. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.269>
- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A. R., Rockenbach, L., Farias, P. F., ... Battastini, A. M. O. (2008). The role of ecto-5′nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1–2), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9877-3>
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Mitri, D. Di, Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., ... Falk, K. (2016). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3. *Blood*, 110(4), 1225–1233. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>.The
- Brinton, L., Sloane, H., Kester, M., & Kelly, K. (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci*, 72(4), 659–671.
- Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M. O., Peruzzi, P., Ogawa, D., Balaj, L., ... Godlewski, J. (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Research*, 74(3), 738–750. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2650>.Extracellular
- Bu, N., Wu, H., Zhang, G., Zhan, S., Zhang, R., Sun, H., ... Wang, H. (2015). Exosomes from Dendritic Cells Loaded with Chaperone-Rich Cell Lysates Elicit a Potent T Cell Immune Response Against Intracranial Glioma in Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(3), 631–643. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0506-9>
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Boireau, W., ... Ghiringhelli, F. (2010). Membrane associated Hsp72 from tumor derived exosomes mediates STAT3 dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid derived suppressor cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 467–471. <https://doi.org/10.1172/JCI40483DS1>
- Chen, T., Guo, J., Yang, M., Zhu, X., & Cao, X. (2011). Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and

- Act as Efficient Tumor Vaccine. *Journal of Immunology*, 186(4), 2219–2228.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002991>
- Chen, W., Liu, X., Lv, M., Chen, L., Zhao, J., Zhong, S., ... Tang, J. (2014). Exosomes from Drug-Resistant Breast Cancer Cells Transmit Chemoresistance by a Horizontal Transfer of MicroRNAs. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095240>
- Cheng, L., Wub, Q., Guryanovab, O. A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J. N., & Bao, S. (2011). Elevated Invasive Potential of Glioblastoma Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Acta*, 406(4), 643–648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.123>.Elevated
- Chu B. *Physics: Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice*. 2nd ed. Dover Publications; Mineola, NY, USA: 2007.
- Chuo, S. T., Chien, J. C., & Lai, C. P. (2018). Imaging extracellular vesicles : current and emerging methods. *Journal of Biomedical Science*, 25, 1–10.
- Clayton, A., Al-Taei, S., Webber, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2011). Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *The Journal of Immunology*, 187(2), 676–683. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003884>
- Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D., & Tabi, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Research*, 67(15), 7458–7466. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3456>
- Climent, N., Martinez-Navio, J. M., Gil, C., Garcia, F., Rovira, C., Hurtado, C., ... Franco, R. (2009). Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV. *Immunology and Cell Biology*, 87, 634–639.
<https://doi.org/10.1038/icb.2009.53>
- Colombo, M; Raposo, G; Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255–289.
- Dai, S., Wan, T., Wang, B., Zhou, X., Xiu, F., Chen, T., ... Abstract. (2005). Cancer Therapy : Preclinical More Efficient Induction of HLA-A * 0201-Restricted and Carcinoembryonic Antigen (CEA) - Specific CTL Response by Immunization with Exosomes Prepared from Heat-Stressed CEA-Positive Tumor Cells. *Cancer Therapy: Preclinical*, 11(20), 7554–7564. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0810>
- Dai, S., Zhou, X., Wang, B., Wang, Q., Fu, Y., Chen, T., ... Cao, X. (2006). Enhanced induction of dendritic cell maturation response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *Journal of Molecular Medicine*, 84(12), 1067–1076.
<https://doi.org/10.1007/s00109-006-0102-0>
- Daßler-Plenker, J., Reiners, K. S., van den Boorn, J. G., Hansen, H. P., Putschli, B., Barnert, S., ... Coch, C. (2016). RIG-I activation induces the release of extracellular vesicles with antitumor activity. *OncImmunology*, 5(10).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1219827>
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., ... Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6),

1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>

- Delcayre, A., Shu, H., & Pecq, J. Le. (2005). Dendritic cell-derived exosomes in cancer immunotherapy : exploiting nature ' s antigen delivery pathway. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 5(3), 537–547.
- Denko, N. C., Fontana, L. A., Hudson, K. M., Sutphin, P. D., Altman, R., & Giaccia, A. J. (2003). Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene*, 22, 5907–5914. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206703>
- Domenis, R., Cesselli, D., Toffoletto, B., Bourkoula, E., Caponnetto, F., Manini, I., ... Gri, G. (2017). Systemic T Cells Immunosuppression of Glioma Stem Cell-Derived Exosomes Is Mediated by Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *PLoS ONE*, 12(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169932>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferrone, S., & Whiteside, T. L. (2007). Tumor Microenvironment and Immune Escape. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 16, 755–774. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2007.08.004>
- Figueró, F., de Oliveira, C. P., Bergamin, L. S., Rockenbach, L., Mendes, F. B., Jandrey, E. H. F., ... Battastini, A. M. O. (2016). Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. *Purinergic Signalling*, 12(2), 303–312. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9505-8>
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development*, 21(21), 2683–2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>
- Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X., & Lu, Z. (2014). miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules*, 119, 1568–1575. <https://doi.org/10.3390/molecules19021568>
- Harshyne, L. A., Hooper, K. M., Andrews, E. G., Nasca, B. J., Kenyon, L. C., Andrews, D. W., & Hooper, D. C. (2015). Glioblastoma exosomes and IGF-1R/AS-ODN are immunogenic stimuli in a translational research immunotherapy paradigm. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(3), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1622-z>
- Hellwinkel, J. E., Redzic, J. S., Harland, T. A., Gunaydin, D., Anchordoquy, T. J., Graner, M. W., ... Colorado, J. E. H. (2016). Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. *Neuro-Oncology*, 18(4), 497–506. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov170>
- Iorgulescu, J. B., Ivan, M. E., Safaee, M., & Parsa, A. T. (2016). The limited capacity of malignant glioma-derived exosomes to suppress peripheral immune effectors. *Journal of Neuroimmunology*, 290, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.11.025>

- Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36(2), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.12.001>
- Kalra, H., Adda, C. G., Liem, M., Ang, C., Mechler, A., Simpson, R. J., ... Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*, 13, 3354–3364. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300282>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., ... Chopp, M. (2013). Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters*, 335(1), 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.019>.Exosomes
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Saffar, H. Al, Anand, S., Zhao, K., ... Mathivanan, S. (2016). ExoCarta : A web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688–692. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>.ExoCarta
- Kesari, S. (2011). Understanding glioblastoma tumor biology: The potential to improve current diagnosis and treatments. *Seminars in Oncology*, 38(SUPPL. 4), S2–S10. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.09.005>
- Khalil, A. A., Kabapy, N. F., Deraz, S. F., & Smith, C. (2011). Heat shock proteins in oncology : Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816(2), 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.05.001>
- Kreke M, Smith R, Hanscome P, Kiel PE, Ibrahim A, inventors; Capricor, Inc., assignee. Processes for producing stable exosome formulations. United States patent application US 14/958,804; 2015 Dec 3
- Kiefer, R., Supler, M. L., Toyka, K. V., & Streit, W. J. (1994). In situ detection of transforming growth factor- β mRNA in experimental rat glioma and reactive glial cells. *Neuroscience Letters*, 166, 161–164.
- Liu, Y., Xiang, X., Zhuang, X., Zhang, S., Liu, C., Cheng, Z., ... Zhang, H. G. (2010). Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells. *American Journal of Pathology*, 176(5), 2490–2499. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090777>
- Liu, Z.-M., Wang, Y.-B., & Yuan, X.-H. (2013). Exosomes from Murine-derived GL26 Cells Promote Glioblastoma Tumor Growth by Reducing Number and Function of CD8+T Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(1), 309–314. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.1.309>
- Logozzi, M., Milito, A. De, Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Perdicchio, M., ... Fais, S. (2009). High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin- 1 in Plasma of Melanoma Patients. *PLoS ONE*, 4(4), e5219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005219>

- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, *114*, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. Von, Figarella, D., Webster, B., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathologica*, *131*(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Mandapathil, M., Lang, S., Gorelik, E., & Whiteside, T. L. (2009). Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *Journal of Immunological Methods*, *346*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.05.004>. Isolation
- Mandapathil, M., Szczepanski, M. J., Harasymczuk, M., Ren, J., Cheng, D., Jackson, E. K., ... Whiteside, T. L. (2012). CD26 expression and adenosine deaminase activity in regulatory T cells (Treg) and CD4 + T effector cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *OncoImmunology*, *1*(5), 659–669.
- Mandapathil, M., Szczepanski, M. J., Szajnik, M., Ren, J., Jackson, E. K., Johnson, J. T., ... Whiteside, T. L. (2010). Adenosine and Prostaglandin E₂ Cooperate in the Suppression of Immune Responses Mediated by Adaptive Regulatory T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(36), 27571–27580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.127100>
- Marabelle, A., Kohrt, H., Sagiv-barfi, I., Ajami, B., Axtell, R. C., Zhou, G., ... Levy, R. (2013). Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(6). <https://doi.org/10.1172/JCI64859>. fits
- Marhaba, R., Klingbeil, P., Nuebel, T., Nazarenko, I., Buechler, M., & Zoeller, M. (2008). CD44 and EpCAM: Cancer-Initiating Cell Markers. *Current Molecular Medicine*, *8*(8), 784–804. <https://doi.org/10.2174/156652408786733667>
- Mescher, M. F., Agarwal, P., Casey, K. A., Hammerbeck, C. D., Xiao, Z., & Curtsinger, J. M. (2007). Molecular Basis for Checkpoints in the CD8 T Cell Response: Tolerance versus Activation. *Seminars in Immunology*, *19*(3), 153–161.
- Montecalvo, A., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. G., Wang, Z., Divito, S. J., ... Morelli, A. E. (2019). Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition. *The Journal of Immunology*, *180*, 3081–3090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3081>
- Muller, L., Muller-Haegle, S., Mitsuhashi, M., Gooding, W., Okada, H., & Whiteside, T. L. (2015). Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival. *OncoImmunology*, *4*(6). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008347>
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, *19*(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>. ARF6-regulated
- Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Higuchi, T., Nakase, H., Sakaki, T., & Konishi,

- N. (2007). Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors 1. *Neuro-Oncology*, 9, 113–123. <https://doi.org/10.1215/15228517-2006-036>
- Niel, G. Van, Porto-carreiro, I., Simoes, S., & Raposo, G. (2006). Membrane Traffic in Physiology and Pathology Exosomes : A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal of Biochemistry*, 140(1), 13–21. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj128>
- Nieto-Sampedro, M., Valle-Argos, B., Gómez-Nicola, D., Fernández-Mayoralas, A., & Nieto-Díaz, M. (2011). Inhibitors of glioma growth that reveal the tumour to the immune system. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 5, 265–314. <https://doi.org/10.4137/CMO.S7685>
- Nogueira, L., Ruiz-ontañón, P., Vazquez-barquero, A., & Fernandez-luna, J. L. (2011). The NFκB pathway : a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget*, 2(8), 646–653.
- Ohkubo, S., Nagata, K., & Nakahata, N. (2007). Adenosine uptake-dependent C6 cell growth inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 577, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.025>
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K., ... Sitkovsky, M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *PNAS*, 103(35), 13132–13137.
- Park, J. E., Tan, H. Sen, Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., ... Sze, S. K. (2010). Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6), 1085–1099. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900381-MCP200>
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., ... Fais, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34211–34222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>
- Porter, K. R., Mccarthy, B. J., Freels, S., Kim, Y., & Davis, F. G. (2010). Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. *Neuro-Oncology*, 12(6), 520–527.
- Preusser, M., Ribaupierre, S. De, & Wo, A. (2011). Current Concepts and Management of Glioblastoma. *Annals in Neurology*, 70, 9–21. <https://doi.org/10.1002/ana.22425>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Sayour, E. J., McLendon, P., McLendon, R., De Leon, G., Reynolds, R., Kresak, J., ... Mitchell, D. A. (2015). Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(4), 419–427. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1651-7>
- Saze, Z., Schuler, P., Hong, C., & Cheng, D. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, 122(July), 9–19. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482406.Z.S>
- Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C., & Mellai, M. (2018). Glioblastoma :

- Microenvironment and Niche Concept. *Cancers*, 11(5), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/cancers11010005>
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>
- Schuler, P. J., Saze, Z., Hong, C.-S., Muller, L., Gillespie, D. G., Cheng, D., ... Whiteside, T. L. (2014). Human CD4⁺ CD39⁺ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73⁺ exosomes or CD73⁺ cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 177(2), 531–543. <https://doi.org/10.1111/cei.12354>
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature*, 2(9), 494–503.
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>
- Sinclair, C. J. D., LaRiviere, C. G., Young, J. D., Cass, C. E., Baldwin, S. A., & Parkinson, F. E. (2002). Purine Uptake and Release in Rat C6 Glioma Cells : Nucleoside Transport and Purine Metabolism Under ATP-Depleting Conditions. *Journal of Neurochemistry*, 75(4), 1528–1538.
- Soffiatti, R., Leoncini, B., & Rudà, R. (2007). New developments in the treatment of malignant gliomas. *Expert Review in Neurotherapeutics*, 7(10), 1313–1326.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., & Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>
- Stagg, J., & Smyth, M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39), 5346–5358. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.292>
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., Bent, M. J. Van Den, Taphoorn, M. J. B., Janzer, R. C., ... Mirimanof, R.-O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembranes*, 645(1), 63–70.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
- Trummer, A., De Rop, C., Tiede, A., Ganser, A., & Eisert, R. (2009). Recovery and composition of microparticles after snap-freezing depends on thawing temperature. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 20(1), 52–56. doi:10.1097/mbc.0b013e32831be9c5
- Vestad, B., Llorente, A., Neurauter, A., Phuyal, S., Kierulf, B., Kierulfa, P., ... Øvstebø, R.

- (2017). Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis : a variation study. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1).
<https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1344087>
- Watters, J. J., Schartner, J. M., & Badie, B. (2005). Microglia function in brain tumors. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 447–455. <https://doi.org/10.1002/jnr.20485>
- Welch, J. L., Madison, M. N., Margolick, J. B., Galvin, S., Gupta, P., Martínez-maza, O., ... Okeoma, C. M. (2017). Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity. *Scientific Reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep45034>
- Whiteside, T. L. (2013). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Onco*, 27(45), 5904–5912. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>.The
- Whiteside, T. L. (2015). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(1), 67–72.
<https://doi.org/10.1007/s00262-013-1490-y>.Regulatory
- Whiteside, T. L., Mandapathil, M., Szczepanski, M., & Szajnik, M. (2011). Mechanisms of tumor escape from the immune system : Adenosine-producing Treg , exosomes and tumor-associated. *Bulletin Du Cancer*, 98(2), E25–E31.
<https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1294>
- Wieckowski, E., & Whiteside, T. L. (2006). Human Tumor – Derived vs Dendritic Cell – Derived Exosomes Have Distinct Biologic Roles and Molecular Profiles. *Immunologic Research*, 36, 247–254.
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lötval, J., Hoen, E. N. N.-, ... Hochberg, F. (2017). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1).
<https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., ... Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 7(3), 297–303. <https://doi.org/10.1038/85438>
- Xie, Y., Bai, O., Zhang, H., Yuan, J., Zong, S., Chibbar, R., ... Xiang, J. (2010). Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8 α CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2655–2666. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00851.x>
- Xie, Y., Zhang, H., Li, W., Deng, Y., Munegowda, M. A., Chibbar, R., ... Xiang, J. (2010). Dendritic Cells Recruit T Cell Exosomes via Exosomal LFA-1 Leading to Inhibition of CD8 α CTL Responses through Downregulation of Peptide/MHC Class I and Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5268–5278.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000386>
- Xu, S., Shao, Q. Q., Sun, J. T., Yang, N., Xie, Q., Wang, D. H., ... Qu, X. (2013). Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro-Oncology*, 15(9), 1160–1172.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/not067>

- Yang, Y., Xiu, F., Cai, Z., Wang, J., Wang, Q., Fu, Y., & Cao, X. (2007). Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *133*(6), 389–399.
<https://doi.org/10.1007/s00432-006-0184-7>
- Zhang, H., Kim, H., Liu, C., Yu, S., Wang, J., William, E., ... Barnes, S. (2007). Curcumin reverses breast tumor exosomes mediated immune suppression of NK cell tumor cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Acta*, *1773*(7), 1116–1123.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.04.015>.Curcumin
- Zhou, H., Yuen, P. S. T., Pisitkun, T., Gonzales, P. A., Yasuda, H., Dear, J. W., ... Star, R. A. (2006). Collection , storage , preservation , and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney International*, *69*, 1471–1476.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000273>
- Zumaquero, E., Muñoz, P., Cobo, M., Lucena, G., Pavón, E. J., Martín, A., ... Zubiaur, M. (2010). Exosomes from human lymphoblastoid B cells express enzymatically active CD38 that is associated with signaling complexes containing CD81, Hsc-70 and Lyn. *Experimental Cell Research*, *316*(16), 2692–2706.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.032>

ANEXO A: Carta de aprovação do CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33505

Título: AVALIAÇÃO DO PAPEL DESEMPENHADO POR EXOSSOMOS DERIVADOS DE CELULAS DE GLIOMA NA MODULAÇÃO DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS E NA PROGRESSÃO TUMORAL

Vigência: 01/07/2017 à 31/07/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI - coordenador desde 01/07/2017

Fabrizio Figueiró - pesquisador desde 01/07/2017

Juliete Nathali Scholl - Aluno de Mestrado desde 01/07/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 25/09/2017 - SALA 330 DO ANEXO - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 70 ratos machos Wistar de 8-9 semanas (220-300g) provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 5 de Outubro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B: Colaborações (Artigos publicados no período do mestrado)

1) Azambuja, J. H., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., Fernandes, M. C., Figueiró, F., Battastini, A.M.O; **Scholl, J.N**; de Oliveira, F.H; Spanevello, R.M; Sévigny, J; Wink, M.R; Stefani, M. A; Teixeira, H.F; Braganhol, E. (2018). *CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth*. Molecular Neurobiology. doi:10.1007/s12035-018-1240-4

2) Gardani, C. F. F., Cappellari, A. R., de Souza, J. B., da Silva, B. T., Engroff, P., Moritz, C. E. J., **Scholl, J.N**; Battastini, A.M.O; Figueiró, F.; Morrone, F. B. (2019). *Hydrolysis of ATP, ADP, and AMP is increased in blood plasma of prostate cancer patients. Purinergic Signalling*.doi:10.1007/s11302-018-9642-3