



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS DE MEMBRANA  
OBTIDAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR LEISHMANIA  
SOBRE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS**

**ANDRÉ CRONEMBERGER ANDRADE**

**Salvador-Bahia  
2014**

**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS DE MEMBRANA  
OBTIDAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR LEISHMANIA  
SOBRE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS**

**ANDRÉ CRONEMBERGER ANDRADE**

Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para  
obtenção do título de Mestre.

**Salvador-Bahia  
2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Cronemberger-Andrade, André

A598e Efeito imunomodulador de vesículas de membrana obtidas de macrófagos infectados por leishmania sobre macrófagos não infectados. [manuscrito] / André Cronemberger Andrade. - 2014.

105 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

Orientador: Profº Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho. Laboratório de Patologia e Biointervenção.

1. Vesículas. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Macrófago. 4. Imunomodulação. 5. Citocinas. I. Título.

CDU 616.993.161

“INVESTIGAÇÃO SOBRE EFEITO IMUNOMODULADOR DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE  
MACRÓFAGO INFECTADO POR LEISHMANIA”

Candidato(a): **ANDRÉ CRONEMBERGER ANDRADE**

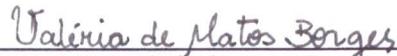
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Jorge Clarêncio de Souza Andrade  
Tecnologista em Saúde Pública  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dra. Valéria de Matos Borges  
Tecnologista em Saúde Pública  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Daniel Abensur Athanzio  
Professor Adjunto  
FAMED/UFBA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, meu orientador, pelo confiança ao longo deste trabalho e por me incentivar a buscar meus objetivos.

Agradeço também à minha família, meus pais principalmente, por todo apoio que me deram, e ao meu irmão, que sempre me aconselhou a nunca perder a motivação.

Aos amigos e colegas do LPBI. Especialmente o nosso grupo B05 (aos que fazem e fizeram parte dele) entre eles Ayling, Cintia, Viviane, Luciana, Carol, Naiara, Andréia, Thassila, Priscila, Fábio, Felipe, Mariana Khouri, Mariana Borges Virginia, Isabela e Pablo que sempre ajudaram durante o mestrado e que também divertiram e enriqueceram durante a vivência no laboratório com nosso querido grupo.

A Gabriela pelo companheirismo, carinho e afeto.

A Cláudio pelo apoio na aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. A Micely e Liliane pela ajuda na citometria de fluxo.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o mestrado e para execução deste trabalho de dissertação.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guérin</i>
C3b	Proteína do complemento 3b
C3bi	Proteína do complemento 3b
CD-	Cluster de diferenciação
cDNA	Ácido desoxirribonucléico circular
CLR	Receptores de lectina do tipo C
CR4	Receptor do complemento tipo 4
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>ELa</i>	Extrato de <i>Leishmania amazonensis</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fc	Fragmento cristalizável
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
gp63	Glicoproteína 63 kDa
HE	Corante hematoxilina-eosina
IL-	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon- <i>gamma</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação- <i>beta</i>
Th1	Célula T auxiliar do tipo 1
Th2	Célula T auxiliar do tipo 2
TLR-	Receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- <i>alfa</i>

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. Efeito imunomodulador de vesículas de membrana obtidas de macrófagos infectados por *Leishmania* sobre macrófagos não infectados. 105 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

Vesículas de membrana (VMs) derivadas de macrófagos infectados com microorganismos intracelulares têm capacidade inflamatória. Estas vesículas podem conter antígenos do patógeno, carrear moléculas de MHC II e componentes celulares que podem atuar como PAMPs ou DAMPs induzindo resposta imune. Na infecção por *Leishmania*, a indução de uma resposta do tipo Th1 é crucial para promoção de proteção contra o parasito. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade imunomoduladora de VMs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* sobre a produção de citocinas por outros macrófagos. VMs foram visualizadas por microscopia eletrônica tanto em preparações celulares como no precipitado obtido por sucessivas centrifugações de sobrenadantes de cultivos celulares. Foi observada por citometria de fluxo a presença de marcadores celulares específicos (F4/80 e CD11b) nas VMs, bem como MHC II. O tratamento de macrófagos não infectados com VMs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ocasionou aumento consistente da produção de IL-12p70 e IL-1 $\beta$ . Estas vesículas poderiam, portanto, favorecer a modulação da resposta imune em favor do combate ao parasito.

**Palavras chave:** vesículas de membrana, *Leishmania amazonensis*, macrófago, imunomodulação, citocinas

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. Immunomodulatory effect of membrane vesicles derived from macrophages infected by *Leishmania* on uninfected macrophages. 105 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Membrane vesicles (MV) derived from macrophages infected with intracellular microbes are proinflammatory. These vesicles contain antigens of the pathogen, carry MHC II molecules and cellular components that can act as PAMPs or DAMPs inducing immune responses. In *Leishmania* infection the induction of a Th1 response is crucial for the protection against the parasite. The aim of the study was to evaluate whether vesicles derived from macrophages infected with *L. amazonensis* had the capacity to modulate the response of other macrophages. MV were visualized by electron microscopy in cellular preparations as well in the precipitate obtained by centrifugation of cell supernatants. Flow cytometry revealed the presence of specific cellular markers (F4/80 and CD11b) in the MV, as well as MHC II. Treatment of non-infected macrophages with MV derived from *L. amazonensis*-infected macrophages consistently caused increased production of IL-12p70 and IL-1 $\beta$ . These vesicles can favor the modulation of the immune response in favor of combating the parasite.

**Key words:** membrane vesicles, *Leishmania amazonensis*, macrophage, immune modulation, cytokines

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
2.1 LEISHMANIOSES	11
2.1.1 <b>Aspectos gerais</b>	<b>11</b>
2.1.2 <b>Leishmaniose tegumentar</b>	<b>12</b>
2.2 INTERAÇÃO MACRÓFAGO/LEISHMANIA	13
2.3 A RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR LEISHMANIA	15
2.4 VESICULAS DE MEMBRANA	16
2.4.1 <b>Aspectos gerais das VMs</b>	<b>16</b>
2.4.2 <b>Corpos apoptóticos</b>	<b>17</b>
2.4.3 <b>Micropartículas</b>	<b>17</b>
2.4.4 <b>Exossomos</b>	<b>18</b>
2.5 FUNÇÕES DAS VESICULAS DE MEMBRANA	19
<b>3. HIPÓTESE</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
4.1 GERAL	22
4.2 ESPECÍFICO	22
<b>5. JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>6. METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
6.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	24
6.2 CULTIVO DOS PARASITOS E PRODUÇÃO DE EXTRATO	24
6.3 OBTENÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA EM MACRÓFAGOS	25
6.4 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS	26
6.5 PRODUÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA A PARTIR DE MACRÓFAGOS	26
6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA E DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM L. AMAZONENSIS	27

6.7	CITOMETRIA DE FLUXO	28
6.8	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS RESIDENTES	28
6.9	TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS COM VESÍCULAS DE MEMBRANA	29
6.10	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE ALAMAR	29
6.11	DOSAGEM DE CITOCINAS	30
6.12	ANALISE ESTATÍSTICA	30
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
7.1	PRODUÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MEDULA ÓSSEA	31
7.2	AVALIAÇÃO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA E DE MACRÓFAGO INFECTADO COM L. AMAZONENSIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	32
7.3	FENOTIPAGEM DOS MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA	34
7.4	FENOTIPAGEM DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS	34
7.5	CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR L. AMAZONENSIS	35
7.6	EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA NA SUPERFÍCIE DE MACROFAGOS INFECTADOS	38
7.7	EFEITO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM L. AMAZONENSIS SOBRE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS	40
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO (artigo submetido para publicação)</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por cerca de 21 protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004; HERWALDT, 1999). Os parasitos do gênero *Leishmania* coevoluíram com seus hospedeiros mamíferos e insetos por milhares de anos. Desta forma não é surpresa que eles se adaptaram a esses hospedeiros e vetores, persistindo nos tecidos e replicando-se, subvertendo a resposta imune do hospedeiro vertebrado, e disseminando para outros hospedeiros da mesma ou de outra espécie animal.

O macrófago desempenha um papel importante no sistema imune e suas principais funções são eliminar o microorganismo e promover a resposta imune adaptativa aos microorganismos invasores. Apesar da existência de mecanismos de defesa, a *Leishmania* sobrevive no fagolisossomo do macrófago, o que é explicado pelo fato do parasito ter desenvolvido estratégias de escape do sistema imune, nas quais estão envolvidos fatores de virulência (SILVEIRA *et al.*, 2009; REAL, MORTARA & RABINOVITCH, 2010; OSORIO Y FORTÉA *et al.*, 2007).

Macrófagos infectados por outros microorganismos intracelulares produzem vesículas de membrana (VMs), que podem induzir respostas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (BHATNAGAR & SCHOREY, 2007; BHATNAGAR *et al.*, 2007; GIRI & SCHOREY, 2008; GIRI *et al.*, 2010). Por causa de suas capacidades imunomoduladoras, VMs estão sendo investigadas como componentes de futuras vacinas (CHAPUT *et al.*, 2004; BEAUVILLAIN *et al.*, 2007; SCHNITZER *et al.*, 2010; DEL CACHO *et al.*, 2011).

A produção de VMs por células dendríticas, mastócitos, macrófagos, linfócitos B e linfócitos T tem sido extensivamente descrita na literatura (O'NEILL & QUAH, 2008). Estas VMs carregam as características fenotípicas das células que a originam. Desta forma, também expressam MHC de classe II, moléculas de superfície de membrana e transportam antígenos (JOHANSSON *et al.*, 2008; THÉRY *et al.*, 2009). As VMs também, por possuírem moléculas

de adesão, citocinas, enzimas, mRNA e DNA, interagem biologicamente com células-alvo. Assim, VMs derivadas de APCs contendo moléculas de MHC de classe II, podendo conter antígeno, podem estimular resposta específica para o antígeno em células T (ZITVOGEL *et al.*, 1998).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSES

#### 2.1.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, os quais estão distribuídos entre os trópicos e zonas subtropicais do continente americano, sul da Europa, Ásia, Oriente Médio, e leste e norte africano, constituindo um problema de saúde pública nesses países. Estima-se que exista em torno de 500.000 novos casos de leishmaniose visceral por ano, sendo que 90% desses casos são em Bangladesh, nordeste da Índia, Nepal, Sudão e nordeste do Brasil. O número de casos novos anuais de leishmaniose cutânea é estimado em 1,5 milhões e 90% dos casos estão localizados no Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru. O agente etiológico das leishmanioses são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, com 21 espécies (DESJEUX. 2004).

A transmissão ocorre pela inoculação na derme de promastigotas através do flebotômico fêmea, a qual é infectada ao realizar repasto sanguíneo no hospedeiro. Podem ocorrer outras formas de transmissão como congênita e por via parenteral (transfusão de sangue, compartilhamento de agulhas e acidente laboratorial) (BRASIL, 2007). No ciclo biológico, a transmissão pode ter caráter antroponótico, como ocorre na Índia de forma endêmica, onde o reservatório identificado é o homem, com vetor flebotômico bastante antropofílico (ciclo homem-flebótomo-homem); antroponótico, em que o cão é reservatório preferencial, como ocorre em zonas rurais do Brasil também como endemia, com o homem sendo eventualmente infectado pelos vetores pouco antropofílicos; ou de zoonose, na qual os animais são hospedeiros exclusivos. De acordo com a espécie de *leishmania* e o sistema imune do hospedeiro, a leishmaniose apresenta diferentes manifestações clínicas e a infecção pode expressar-se como doença cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

O diagnóstico é feito com base em dados clínicos e de confirmação laboratorial. A confirmação é feita com através do encontro de parasitos em exame parasitológico direto (ou cultura), ou através de reação sorológica. Indivíduos clinicamente suspeitos de área endêmica, mesmo sem confirmação laboratorial, mas com resposta favorável ao teste terapêutico, podem também assumir a classificação de caso confirmado da doença (BRASIL, 2007).

O tratamento específico se faz com agentes antileishmanióticos e assistência terapêutica de suporte, quando o quadro, muitas vezes grave, demanda (BRASIL, 2006; 2007).

### 2.1.3 Leishmaniose tegumentar

Os parasitos causadores da leishmaniose tegumentar pertencem tanto ao subgênero *Leishmania* quanto *Vianna*. Na Europa, Ásia e África (velho mundo) as leishmanioses tegumentares são causadas pelas espécies *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) aethiopica*. No continente americano as espécies causadoras das leishmanioses tegumentares são *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) venezuelensis*, *Leishmania (L.) pifanoi*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, e *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) lindenbergi* e *Leishmania (V.) naiffi* (SILVEIRA, LAINSON, CORBETT, 2004; GOTO & LINDOSO, 2012). As espécies mais prevalentes na América Latina são *L. (V.) braziliensis* seguida da *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (CARVALHO, 2012). A leishmaniose tegumentar se manifesta em três principais formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada ou disseminada, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose cutânea difusa. No Brasil, a *L. (V.) braziliensis* é responsável por causar lesões cutâneas localizadas, múltiplas ou disseminadas como também afetar as mucosas. A *L. (L.) amazonensis* pode causar lesões localizadas e difusas. A *L. (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões cutâneas localizadas e disseminadas (SILVEIRA, LAINSON, CORBETT, 2004). Nas últimas décadas,

o número de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil aumentou, passando de 5.000 casos notificados na década de 80 para 25.000 casos notificados no ano de 2005 (BRASIL, 2007). Na Bahia as principais espécies causadoras da leishmaniose tegumentar são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, o mesmo ocorrendo nos demais estados em alguns casos somente com a presença da *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2007). A maior diversidade de espécies é encontrada na região amazônica.

A leishmaniose cutânea consiste em uma ou mais úlceras que tendem a se cicatrizar. Em alguns casos em que há múltiplas lesões podem ocorrer cicatrizes e deformidades de difícil tratamento. Pode haver infecção secundária nas lesões, ocasionando inflamação e dor. A leishmaniose cutânea difusa ocorre em pacientes com resposta imune celular deficiente (baixa produção de INF- $\gamma$  e produção alta de IL-10), havendo uma grade proliferação do parasito e disseminação da infecção. Em contraponto, quando há uma resposta imune celular muito intensa (produção alta de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e baixa de IL-10), a resposta imune exarcebada causa lesões principalmente nas mucosas, caracterizando a leishmaniose mucocutânea. A resposta imune do hospedeiro e a variabilidade genética do parasito estão relacionadas à expressão clínica e ao prognóstico da doença (HERWALDT, 1999; DESJEUX, 2004; BRASIL, 2007; CARVALHO, 2012).

## 2.2 INTERAÇÃO MACRÓFAGO/LEISHMANIA

A inoculação na derme de promastigotas de *Leishmania* através do flebotomíneo (Diptera: Psychodidae) é responsável pelo início do ciclo antroponozoonótico das leishmanioses. As formas promastigotas em fase metacíclica infectam preferencialmente macrófagos, podendo também infectar células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos (BOGDAN *et al.*, 2000; PRINA *et al.*, 2004; JOHN & HUNTER, 2008; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008; PETERS *et al.*, 2008). A internalização ocorre pela ação dos pseudopodos, resultando em envolvimento pela membrana e na formação do

fagolisso (RITTING & BOGDAN, 2000). As formas promastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos se diferenciam em formas ovais amastigotas. Os amastigotas, após replicarem-se, infectam outras células, disseminando a infecção no hospedeiro (CHANG, 1983; revisto por VANNIER-SANTOS, MARTINY, DE SOUZA, 2002). É conhecido que o desenvolvimento da doença e a interação macrófago-leishmania podem variar a depender da espécie infectante.

Ao penetrar na pele, o parasita primeiramente tem que evadir o sistema imune inato, estando exposto ao sistema do complemento. As formas promastigotas procíclicas quando se desenvolvem para a forma infectante metacíclica tem sua membrana alterada com um aumento da expressão de lipofosfoglicano (LPG), o qual previne a formação do complexo C5b-C9 (complexo de ataque a membrana - MAC) (PUENTES *et al.*, 1990). Outro fator de virulência é a proteinase gp63 que cliva o C3b criando a forma inativa iC3b, também prevenindo a formação do complexo C5b-C9 (SACKS & SHER, 2002).

Assim que os macrófagos são recrutados para o sitio de infecção eles fagocitam parasitos livres, através de receptores de manose-fucose (CHANNON *et al.*, 1984), CR4 (TALAMAS-ROHANA *et al.*, 1990), de fibronectina (RIZVI *et al.*, 1988), de Fc (CHANG, 1981) e de proteína C reativa (CULLEY *et al.*, 1996), e polimorfonucleares infectados/apoptóticos, tornando-se células hospedeiras finais para replicação do parasito como também células responsáveis pela destruição do parasito. A infecção do macrófago leva à expressão de muitos genes responsáveis em produzir citocinas capazes de estimular a resistência ao patógeno ou a uma resposta inflamatória. Os macrófagos também podem ser ativados por diferentes sinais, levando a diferentes desfechos na doença. A ativação apropriada dos macrófagos é crucial para eliminação do patógeno intracelular (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSELL, 1999).

### 2.3A RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

A indução de uma resposta imune protetora contra *Leishmania* é geralmente atribuída a uma resposta específica de células do tipo Th1 (SYPEK, *et al.*, 1993; HEINZEL *et al.*, 1993). A liberação de IL-12 por macrófagos e células dendríticas leva a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e a diferenciação de células Th0 em células T helper tipo 1 (Th1), também produtoras de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é um dos principais estímulos para o desenvolvimento de resistência à maioria dos patógenos intracelulares, entre os quais inclui-se a *Leishmania* (TRICHERI, 1995; CARREIRA *et al.*, 1996).

Entretanto, a infecção do macrófago pela *Leishmania* inibe seletivamente a produção de IL-12 (CARRERA, *et al.*, 1996). A administração in vivo de IL-12 recombinante em modelo murino susceptível (BALB/c) conferiu resistência a *L. major* pelo aumento na produção de IFN- $\gamma$  e inibição de citocinas envolvidas na resposta Th2 (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). O papel da IL-12 em induzir e estimular uma resposta imune inata e mediada por células T no desenvolvimento de resistência já foi demonstrado em outros patógenos intracelulares (*Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*) (HSIEH *et al.*, 1993; TRIPP *et al.*, 1993; COOPER *et al.*, 1955).

O controle da infecção no hospedeiro depende então da resposta imune mediada por células. Uma das mais importantes características da resposta imune à *Leishmania* em camundongos é a polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em subpopulações: Th1, ligada à produção de IFN- $\gamma$ ; e Th2, ligada à produção de IL-10, IL-4 e IL-5 (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). A resolução e resistência à infecção estariam relacionadas à produção de citocinas Th1 e a susceptibilidade à produção de citocinas Th2. Em humanos, contudo, esta polarização da resposta imunológica é difícil de determinar, uma vez que as quantidades de citocinas secretadas são demasiadamente elevadas no início da infecção (CALDAS *et al.*, 2005). Ainda assim, indivíduos podem cursar ou de forma assintomática, em que concentrações de IFN- $\gamma$  estão elevadas, e a resposta linfoproliferativa intensa, ou, em outro extremo, com concentrações baixas de IFN- $\gamma$  e resposta linfoproliferativa reduzida (BACELLAR &

CARVALHO, 2005). A citocina IL-10 é importante na patogênese das leishmanioses, pois se contrapõe à atividade de IFN- $\gamma$  e IL-12, modulando respostas demasiadamente inflamatórias e lesivas aos tecidos do hospedeiro (BACELLAR & CARVALHO, 2005; CARVALHO *et al.*, 2012).

A IL-17 também pode desempenhar um papel importante na leishmaniose, pois foi visto que em pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa há produção da citocina em culturas de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania* (BACELLAR *et al.*, 2009). Em BALB/c e em humanos foi visto que a IL-23 promove a produção da IL-17 que resulta em agravo da doença principalmente por intensa resposta neutrofílica (LOPEZ KOSTKA *et al.*, 2009; BOAVENTURA *et al.*, 2010). O contrário foi visto em modelo de leishmaniose visceral, no qual a resposta de células Th17 foi fortemente associada à proteção contra *L. donovani* (PITTA *et al.*, 2009).

## 2.4 VESÍCULAS DE MEMBRANA (VMs)

### 2.4.1 Aspectos gerais das VMs

A comunicação entre células ocorre por diversos mecanismos, podendo ser por fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, lipídios, óxido nítrico, moléculas de adesão e contato entre células. As VMs podem também atuar como mensageiras entre as células (THÉRY *et al.*, 2009).

As vesículas de membrana são importantes comunicadoras intercelulares e recentemente trabalhos tem avaliado o papel destas na interação parasito-hospedeiro. Foi visto que exossomos derivados de *L. donovani* são capazes de modular a resposta imune inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-8 e aumentando a produção de IL-10 em monócitos humanos (SILVERMAN *et al.*, 2010). Em exossomos derivados macrófagos J774 infectados com *L. mexicana* foram encontrados a proteinase GP63 de *Leishmania* e também foi observada a expressão de genes relacionados à resposta imune (HASSANI & OLIVER, 2013).

As vesículas de membrana liberadas pelas células possuem bicamada lipídica assim como as células. Estas vesículas também possuem conteúdo citoplasmático e compartilham os componentes da membrana das células a qual originaram. A liberação das vesículas ocorre naturalmente de forma fisiológica podendo também serem liberadas por células em processo de morte/apoptose ou ainda por ativação celular. Na literatura estão descritas três principais populações de VMs: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (THÉRY *et al.*, 2009).

### **2.4.2 Corpos apoptóticos**

Diferentemente das demais vesículas de membrana, que são liberadas pela ativação celular e nos estágios iniciais da apoptose, os corpos apoptóticos são formados nas fases finais do processo apoptótico, tendo maiores diâmetro (1 a 5  $\mu\text{m}$ ) e volume (HRISTOV *et al.*, 2004; CLINE & RADIC, 2004) do que os das demais VMs. Os corpos apoptóticos podem ser fagocitados (BELLONE *et al.*, 1997), transferir DNA das células dos quais foram originados (HOLMEGREN *et al.*, 1999; BERGSMEDH *et al.*, 2001) e expor fosfatidilserina (BEYER & PISETSKY, 2010).

### **2.4.3 Micropartículas**

As micropartículas foram inicialmente descritas por Wolf na década de 60 como derivadas de plaquetas, mas atualmente são conhecidas por serem liberadas por células de procariotos assim como de eucariotos, e podem ser consideradas uma das principais vias de comunicação intercelulares (THÉRY *et al.*, 2009). As micropartículas são liberadas de células saudáveis ou não e esta liberação de vesículas derivadas da membrana é um fenômeno fisiológico. As micropartículas são fragmentos celulares com um diâmetro menor do que um micrômetro (100-1000nm), envolvidas por membrana lipídica e com componentes citoplasmáticos como proteínas e ácidos nucleicos. São

conhecidas também como microvesículas e ectossomos. Essas vesículas são liberadas a partir de brotamento da membrana plasmática de células, após ativação celular ou apoptose (ZWAAL, SCHROIT, 1997).

As micropartículas podem ser caracterizadas pela presença de moléculas de superfície das células das quais foram derivadas e pela exposição de fosfatidilserina (COCCUCI *et al.*, 2009; THERY *et al.*, 2009).

A liberação das micropartículas está associada ao aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular, o que leva a mudanças na simetria da membrana plasmática ocasionando exposição principalmente de fosfatidilserina (BENAMEUR *et al.*, 2009). Esta liberação também favorece a comunicação celular e a secreção de citocinas, o processo inflamatório e a progressão tumoral (COCCUCI *et al.*, 2009).

#### **2.4.4 Exossomos**

Os exossomos são pequenas vesículas de origem endossomal que são liberadas por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, com capacidade de modular a resposta imunológica. Eles variam de tamanho entre 40 a 100 nm, tem formato arredondado e achatado, sendo sua morfologia homogênia e sedimentam a 100.000 g (MECKES & RAAB-TRAUB, 2011). A geração de exossomos é através de formação de corpos multivesiculares que se fundem a membrana plasmática e liberam estas vesículas no meio extracelular (FEVRIER & RAPOSO, 2004).

Exossomos podem ser derivados de APCs, células T, reticulócitos, mastócitos, células tumorais e plaquetas (THERY *et al.*, 2001; WUBBOLTS *et al.*, 2003; DARDALHON *et al.*, 2005; HEIJEN *et al.*, 1999; RAPOSO *et al.*, 1996; SKOKOS *et al.*, 2003; WOLFERS *et al.*, 2001). A caracterização dos exossomos é feita principalmente por *Western blot*, citometria de fluxo e análise proteômica. Estes estudos revelaram que carregam proteínas celulares específicas como MHC classe I e II, proteínas do citoesqueleto (actina e tubulina), proteínas de transporte de membrana e de fusão (anexinas e Rab),

outras proteínas de superfície de membrana (CD63, CD81, CD82, CD9 e CD86), integrinas ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha \text{M}\beta 2$  e  $\beta 2$ ) e proteínas de choque séptico (Hsp70 e Hsp90) (THERY *et al.*, 2001; THERY, ZITVOGEL & AMIGORENA, 2002).

Exossomos foram também encontrados em fluidos biológicos como urina (CONDE-VANCELLS *et al.*, 2010; GONZALES *et al.*, 2010), plasma (KHAN *et al.*, 2012), ascite (PENG *et al.*, 2011), leite materno (ADMYRE *et al.*, 2007) e lavado bronco alveolar (PRADO *et al.*, 2008).

## 2.4 FUNÇÕES DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA

As principais funções atribuídas das vesículas sobre células do sistema imune são a capacidade de modular estas células ativando, diferenciando e inibindo. Este fato se deve a capacidade das vesículas em apresentar ou transferir através do MHC como também transferir antígenos que estão contidos nestas vesículas (THERY *et al.*, 2009).

Exossomos derivados de APCs possuem quantidades maiores de moléculas de MHC II devido a sua origem a partir de compartimentos endocíticos na qual são formadas as moléculas de MHC II (RAPOSO *et al.*, 1996; THERY *et al.*, 1999).

Micropartículas derivadas de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* carregam antígenos e promovem inflamação ativando células T CD4+ (WALTERS *et al.*, 2013) e micropartículas derivadas de macrófagos infectados com *L. monocytogenes* também carregam antígenos induzindo resposta imune protetora (ZHANG *et al.*, 2012). Além de induzir à resposta imune as microvesículas também podem inibir como no caso de microvesículas derivadas de neutrófilos inibem a secreção de IL-8 e TNF- $\alpha$  em macrófagos e a maturação de células dendríticas (EKEN *et al.*, 2008). Estudos mostraram também a capacidade dos corpos apoptóticos em modular a resposta imune (SAVILL *et al.*, 2002).

Quando derivadas de APCs os exossomos também podem modular a resposta imunológica, podendo atuar como comunicadores celulares,

promovendo a resposta imune adaptativa apresentando MHC classe II a células TCD4+ naïve como também induzindo resposta específica de células T CD8+ (RAPOSO *et al.*, 1996; ZITVOGEL *et al.*, 1998; THERY *et al.*, 2002; ADMYRE *et al.*, 2006). Foi evidenciada também a capacidade dos exossomos de carrear antígenos de células infectadas com microrganismos intracelulares como micobactérias (BHATNAGAR *et al.*, 2007), citomegalovirus (WALKER *et al.*, 2009) e *Leishmania* (SILVERMAN *et al.*, 2010), como também de células tumorais (WOLFERS *et al.*, 2001). Em macrófagos infectados com patógenos intracelulares (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Toxoplasma gondii*) além de carrear antígenos esses exossomos também induzem a secreção de citocinas próinflamatórias por outros macrófagos (BHATNAGAR *et al.*, 2007; BHATNAGAR & SCHOREY, 2007). Exossomos derivados de secreções como fluido broncoaveolar são capazes de se ligar a molécula de TNF- $\alpha$  inibindo sua atividade *in vivo* (HAWARI *et al.*, 2004).

Foi visto que microvesículas derivadas de células de melanoma expressando fosfatidilserina induzem a expressão de TGF- $\beta$ , o que promove supressão da resposta imunológica e progressão do tumor (LIMA *et al.*, 2009). Macrófagos e outras células fagocitárias podem internalizar micropartículas originadas de células apresentadoras de antígenos (APCs), recebendo antígenos ou mRNA (THERY *et al.*, 2009). Alguns trabalhos sugerem a ativação de macrófagos pelas micropartículas ocorre via TLR4 (THOMAS & SALTER, 2009).

### 3. HIPÓTESE

O tratamento *in vitro* de macrófagos com vesículas de membrana derivadas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* é capaz de alterar a produção de citocinas por estas células.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. GERAL

Avaliar o possível papel das vesículas de membrana derivadas de macrófagos como potencial fator imunomodulador na infecção por *L. amazonensis*.

### 4.2. ESPECÍFICO

Evidenciar a produção e liberação de vesículas de membrana a partir de macrófagos diferenciados de medula óssea.

Caracterizar as vesículas de membrana através da citometria de fluxo avaliando sua origem pela presença de marcadores celulares de superfície comuns a macrófagos e quanto ao diâmetro e aspecto na microscopia eletrônica de transmissão.

Testar as vesículas de membrana derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* quanto a um possível efeito sobre macrófagos não infectados.

## 5. JUSTIFICATIVA

Vesículas de membrana atuam principalmente como mensageiras intercelulares, sendo reconhecidas como estruturas funcionais envolvidas em diversos processos biológicos. Como células infectadas ou em apoptose liberam vesículas de membrana, é importante testar se estas vesículas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* têm atividade imunomoduladora.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c de ambos os sexos, com idade entre 4 a 8 semanas, mantidos em microisoladores no biotério do Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia. Durante todo o período da experimentação, os animais receberam ração balanceada e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão do Uso de Animais de Experimentação do IGM.

### 6.2. CULTIVO DOS PARASITOS E PRODUÇÃO DE EXTRATO

Parasitas da espécie *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA/125) foram mantidos por passagens regulares em camundongos BALB/c e hamsters Golden (*Mesocricetus auratus*). As formas promastigotas, derivadas de amastigotas teciduais, foram cultivadas sob condições estéreis a 24° C em meio de Schneider (*Schneider's drosophyla medium*; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; Gibco, Grand Island, NY, EUA). Um extrato de *L. amazonensis* (ELa) foi preparado como descrito na literatura (SILVA *et al.*, 2011), a partir de amastigotas axênicos de *L. amazonensis*, obtido segundo protocolo desenvolvido por Teixeira e colaboradores (2002).

### 6.3. OBTENÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA EM MACRÓFAGOS

Para obtenção de macrófagos de origem mielóide, foram extraídas células da medula óssea de camundongos BALB/c, de qualquer sexo, entre 6 a 8 semanas, a partir da retirada dos fêmures desses animais em condições estéreis. O canal medular foi transpassado com uma agulha 25x7 e foram injetados 5 mL de RPMI completo a 4° C (RPMI suplementado com 10% de SFB, gentamicina a 50 µg.mL<sup>-1</sup>, bicarbonato de sódio a 3,6 g.L<sup>-1</sup>, HEPES a 25 mM e glutamina a 2 mM), contendo 30% de sobrenadante da cultura de células X-63 (linhagem celular transfectada com o cDNA para GM-CSF) (ZAL; VOLKMANN; STOCKINGER, 1994), para retirada de células da medula óssea. As células foram transferidas para um tubo de 15 mL e os grumos celulares desfeitos através da homogeneização com auxílio de uma pipeta Pasteur. O conteúdo da medula foi plaqueado em poços de placas plásticas de microbiologia simples, os quais foram vedados com parafilme. As placas foram mantidas em estufa a 37° C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias. No terceiro dia foram adicionados mais 10 mL de meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante da cultura de células X-63. No sétimo dia, para obtenção de macrófagos, o sobrenadante da cultura foi colhido para se fazer uma rápida e delicada lavagem da placa. Em seguida lavou-se três vezes a placa com HBSS (*Hank's balanced salt solution*) gelado (4° C) sem Ca<sup>++</sup>, transferindo-se os lavados contendo os macrófagos para um tubo de 50 mL. O lavado foi centrifugado a 500 g durante 10 minutos a 4° C e as células precipitadas ressuspensas em RPMI completo. A viabilidade celular foi determinada utilizando uma solução de azul de Trypan a 0,4% em câmara de Neubauer. A proporção dessas células expressando os marcadores macrófágicos CD11b anti-F4/80 foi de 87,9 %. Foram plaqueadas 10<sup>6</sup> células/mL em garrafas de cultura de 150 cm<sup>2</sup> ou em placas de 24 poços contendo meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante da cultura de células X-63.

#### 6.4. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

Foram plaqueados  $2 \times 10^5$  macrófagos/mL em placas de 24 poços, com ou sem lamínulas, em 1 mL de meio RPMI completo e incubados em estufa a  $37^\circ \text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram lavados uma vez com salina estéril por centrifugação a 1.800 g por 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . Em seguida foi realizada uma centrifugação a 50 g por 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$  em salina para obterem-se somente leishmânias viáveis no sobrenadante. Os promastigotas foram lavados novamente duas vezes com salina estéril, centrifugando a 1.800 g por 10 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . Após a última lavagem, os promastigotas foram ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado com 10% de SBF, e os parasitos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços com os macrófagos, a razões de 10 e 50 parasitos por macrófago, incubando-se em estufa a  $37^\circ \text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 12 horas. As leishmânias que não foram internalizadas foram então removidas com uma lavagem dos poços com RPMI suplementado com 10% de SBF e os poços cultivados durante 1, 3, 6, 9 e 12 dias. O sobrenadante do nono dia foi coletado para produção de VMs. As lamínulas foram coradas com HE para estimar a taxa de infecção e o número de leishmânias por macrófago.

#### 6.5. PRODUÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA A PARTIR DE MACRÓFAGOS

Para isolar as VMs, o sobrenadante da cultura foi centrifugado a 8.000 g durante 5 minutos a  $4^\circ \text{C}$  para remover células residuais e detritos celulares. O sobrenadante contendo VMs foi lavado uma vez com HBSS por centrifugação a 100.000 g durante 45 minutos a  $4^\circ \text{C}$  e resuspenso em HBSS.

## 6.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA E DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*

As VMs foram fixadas com tampão cacodilato de sódio e paraformaldeído a 2% por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as VMs foram centrifugadas a 100.000 g por 45 minutos e ressuspensas em solução salina a 150 mM tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) filtrada em filtro com poros de 0,22 µm de diâmetro. As VMs foram adsorvidas a grades de cobre (Formvar) por 20 minutos. Foi utilizado ácido fosfotungstênio a 2% para contrastação negativa. A visualização das VMs foi feita utilizando um microscópio eletrônico de transmissão.

Os macrófagos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH7,4, por 2 horas a temperatura ambiente e em seguida foram realizadas três lavagens com tampão cacodilato a 0,1 M. A pos-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8%, e cloreto de cálcio a 5mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1M por 1 hora a temperatura ambiente seguida de três lavagens com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. A desidratação foi feita com séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% - uma vez e 100% três vezes), por 10 minutos cada a temperatura ambiente. A substituição foi feita com uma mistura de acetona absoluta com resina (Polybed 812) na proporção 1:1 por 16 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador por 6 horas e, em seguida, mantido em estufa a 60° C por 3 dias para polimerizar. Após esse período, o bloco foi cortado em ultramicrotomo e contrastado, e o material observado no microscópio eletrônico de transmissão.

## 6.7. CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a capacidade de produção de VMs pelos macrófagos, as células foram marcadas com PKH26 (corante fluorescente que marca as caudas alifáticas longas na região de lipídios na membrana celular) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para determinar o tamanho das partículas avaliadas na citometria de fluxo foram utilizados “beads” de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Invitrogen, CA, EUA). Para caracterização dos macrófagos de origem mielóide e das VMs, foram suspensas  $2 \times 10^6$  células em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de citometria de fluxo (5% de SBF e 0,1% de azida sódica em PBS) a 4° C. As células foram centrifugadas a 750 g por 20 segundos e as VMs a 100.000 g por 45 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e as células e/ou as VMs foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos a 4° C no escuro com 20  $\mu\text{L}$  de diluições de anticorpos anti-CD11b, anti-F4/80 ou anti-MHC tipo II de camundongo (BD, San Diego, CA, EUA) como também com anexina V e PI (SIGMA, St Louis, MO, EUA). As células e as VMs foram lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de tampão de citometria de fluxo, as células centrifugadas a 750 g durante 20 segundos e as VMs a 100.000 g por 45 min por duas vezes a 4° C, ressuspensas no mesmo tampão e submetidas a citometria de fluxo.

## 6.8. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS RESIDENTES

Os macrófagos residentes foram obtidos por lavagens da cavidade peritoneal de BALB/c com 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) gelada contendo 20 UI.mL<sup>-1</sup> de heparina. O lavado peritoneal foi centrifugado a 300 g durante 10 minutos a 4° C, e as células foram ressuspensas em meio DMEM gelado (*Dulbecco's modified Eagle medium*; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de SFB, gentamicina a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , bicarbonato de sódio a 3,6 g.L<sup>-1</sup>, HEPES a 25 mM e glutamina a 2 mM.

## 6.9. TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS COM VESÍCULAS DE MEMBRANA

Os macrófagos residentes foram distribuídos em placas de 24 poços ( $10^6$ /poço) e, após 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  e a 5%  $\text{CO}_2$ , as culturas foram lavadas com solução salina para a remoção das células não aderentes. Os macrófagos foram incubados por 1, 3, 6, 9 ou 12 dias com VMmeio (vesículas de membrana de macrófago não infectado) e VMsLa (vesícula de membrana de macrófago infectado com *L. amazonensis*) na ausência ou na presença de LPS ( $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; *Escherichia coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Nos cultivos que receberam VMmeio e VMLa na ausência de LPS, foram adicionados  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  de polimixina B (Sigma, St. Louis, CA, EUA) para descartar a possibilidade de que possível contaminação por LPS compromettesse a interpretação dos resultados porventura obtidos. As concentrações de VMs utilizadas no tratamento foram as mesmas concentrações que se encontravam nos sobrenadantes das culturas de macrófago que as produziram no nono dia de cultivo. Após 48 horas do tratamento, os sobrenadantes foram coletados e analisados em ensaios para detecção de citocinas.

## 6.10. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE ALAMAR

Um mL de RPMI completo contendo *Alamar blue* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 10% foi adicionado a culturas de  $10^6$  macrófagos/mL, em placas de 24 poços, nos dias 1, 3, 6, 9 e 12 pós-infecção com *Leishmania*. Após incubação por 4 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , a absorbância foi lida em microplaca de 96 poços nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Como controles foram usados poços somente com o meio de cultura (branco) e o meio com o *Alamar blue* (controle negativo). A percentagem de redução do *Alamar blue* em relação ao controle foi calculada pela fórmula:

$$\frac{(\varepsilon_{\text{ox}})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{\text{ox}})\lambda_1 A \lambda_2}{(\varepsilon_{\text{red}})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\varepsilon_{\text{red}})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

, onde  $\varepsilon_{\text{ox}}$  = coeficiente de extinção molar de azul de Alamar na forma oxidada (azul),  $\varepsilon_{\text{red}}$  = coeficiente de extinção molar de azul de Alamar na forma reduzida (rosa), A = absorbância dos poços, A' = absorbância do controle negativo,  $\lambda_1$  = 570 nm, e  $\lambda_2$  = 600 nm.

#### 6.11. DOSAGEM DE CITOCINAS

A detecção da concentração de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-10 e IL-1b) foi determinada pelo *kit* Ready-Set-Go® (Ebiosciences, San Diego, CA, EUA), seguindo orientações do fabricante.

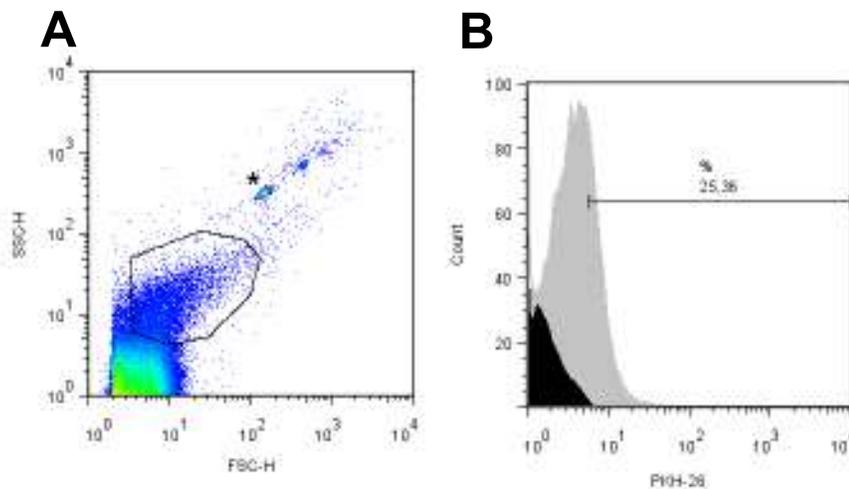
#### 6.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a identificação de diferenças estatisticamente significantes, considerando nível crítico de significância de 95%, e assumindo uma distribuição não gaussiana dos dados, os resultados de dois grupos experimentais quanto a concentrações de citocinas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Quando comparados mais de dois grupos foi realizado o teste de Friedman seguido de pós teste de Dunn. Tanto no teste de Friedman quanto no de Wilcoxon para amostras pareadas, os resultados obtidos de cada experimento foram pareados entre si. A determinação do tipo de distribuição foi feita pelo teste de D'Agostino e Pearson. As comparações entre dois grupos experimentais, quanto à viabilidade celular, foram feitas pelo teste U de Mann-Whitney.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. PRODUÇÃO DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE MEDULA ÓSSEA

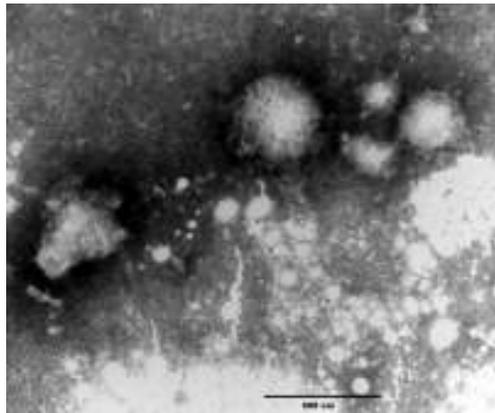
Para determinar se o método utilizado era capaz de isolar vesículas de membrana derivadas de macrófagos de medula óssea, os mesmos foram marcados na cultura com PKH26 (Invitrogen, St Louis, MO, EUA) (Figura 1). Em seguida as células foram estimuladas com ELa (100 µg/mL) para promover a vesiculação (dados não publicados). Após o estímulo, o sobrenadante foi coletado para obtenção de VMs e analisado no citômetro de fluxo para visualizar a população de vesículas, comparando-a quanto ao tamanho com esferas de 1 µm de diâmetro. Foi selecionada a população na área demarcada na figura 1A para analisar a intensidade de marcação para as vesículas originadas de células que foram marcadas com PKH26 na figura 1B.



**Figura 1. Citometria de fluxo das vesículas de membrana (VMs) derivadas de macrófagos estimulados com um extrato de *L. amazonensis*. A, análise de tamanho e granulometria mostrando a seleção da população de VMs que se encontra demarcada na área em destaque utilizando como referência esferas (beads) com 1 µm de diâmetro (asterisco); B, análise de VMs marcadas com o corante para membrana celular PKH26 (histograma preto) em relação as VMs não marcadas (histograma cinza).**

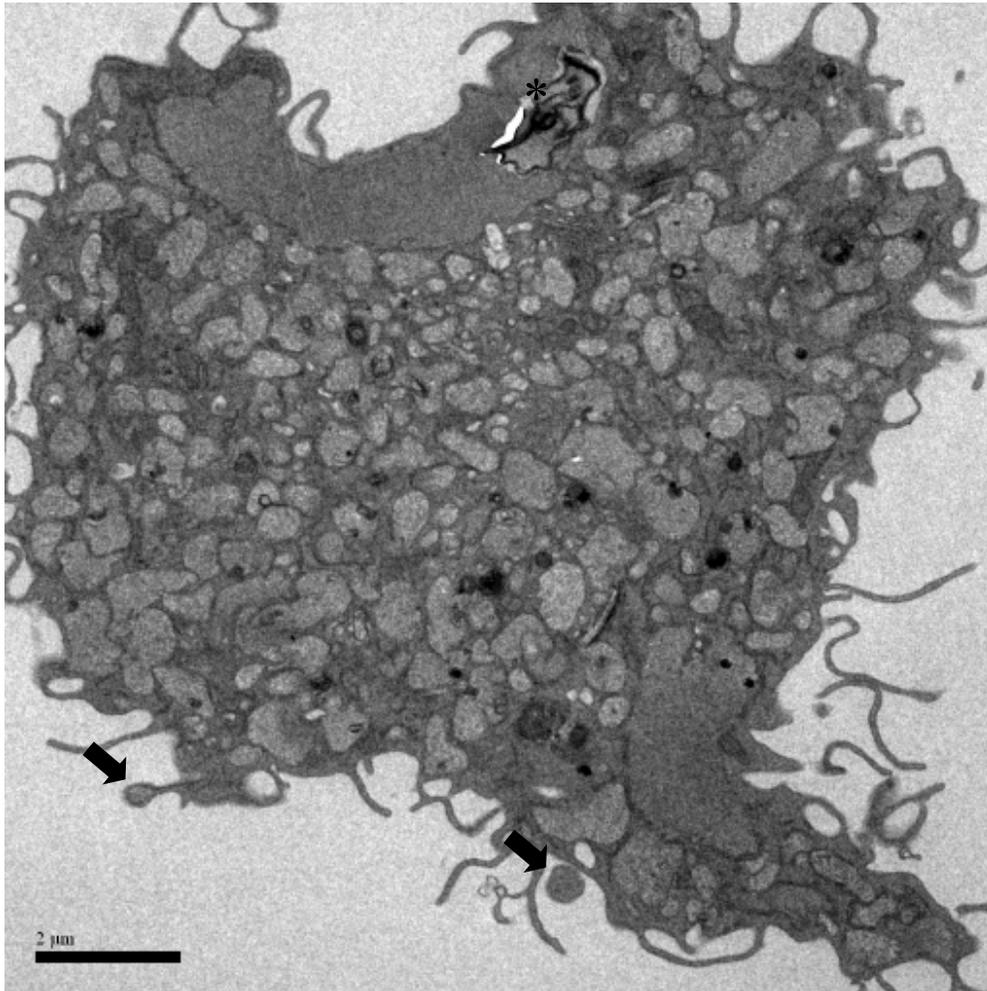
## 7.2. AVALIAÇÃO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA E DE MACRÓFAGO INFECTADO COM *L. AMAZONENSIS* POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As VMs apresentaram-se em formatos esféricos e com diâmetros que variaram de 50 a 300 nm ao serem analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2).



**Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão das vesículas de membrana (VMs) derivadas de macrófago.** As VMs foram adsorvidas a grades de cobre (Formvar) por 20 minutos. Foi utilizado ácido fosfotungstênio a 2% para contrastação negativa. Barra de escala = 500 nm.

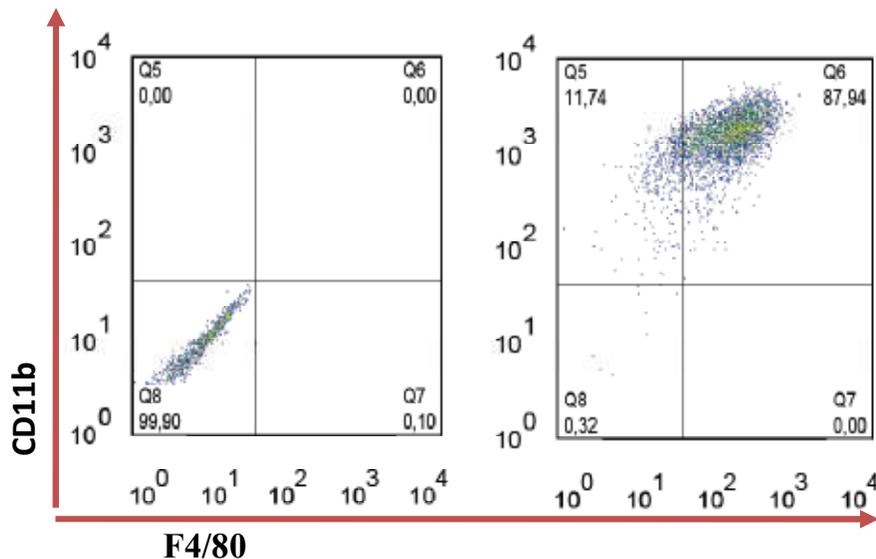
Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, sendo possível visualizar a liberação de vesículas a partir desses macrófagos (indicadas por setas na Figura 3). O conteúdo das vesículas teve densidade semelhante à do citosol e elas estavam envoltas por membrana citoplasmática. Uma delas encontrava-se destacada e a outra aparentemente em formação.



**Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão do macrófago infectado com *L. amazonensis* liberando vesículas de membrana (VMs).** Os macrófagos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2% e a pos-fixação foi feita com tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8%, e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1M. As setas pretas mostram as VMs e o asterisco um amastigota de *L. amazonensis*. Barra de escala = 2  $\mu$ m.

### 7.3. FENOTIPAGEM DOS MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA

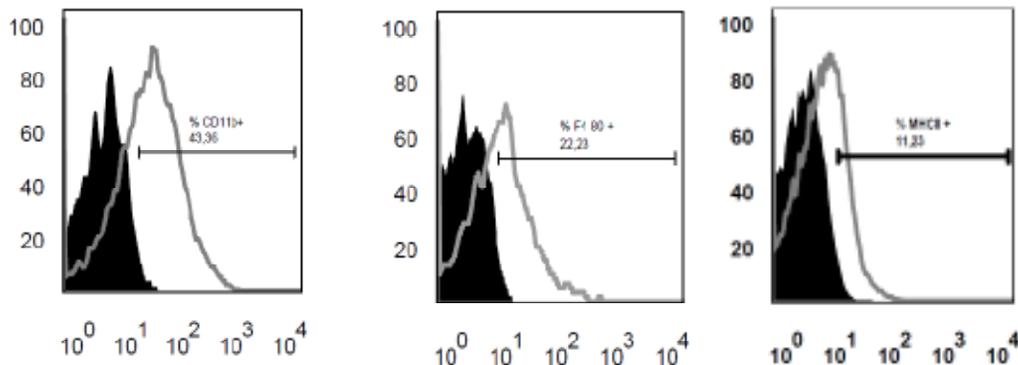
As células diferenciadas a partir de células da medula óssea foram marcadas com anticorpos de superfície específicos para monócitos murinos (anti-F4/80 e anti-CD11b). Uma proporção de 87,9% de células duplamente marcadas para anti-F4/80 e anti-CD11b foi observada em citometria de fluxo.



**Figura 4. Citometria de fluxo para fenotipagem de macrófagos de origem mielóide.** Macrófagos derivados da diferenciação com GM-CSF a partir de células da medula óssea foram fenotipados com anti-F4/80-PE e anti-CD11b-PE-Cy5 para fenotipagem. 87,9 % das células foram duplamente marcadas.

### 7.4. FENOTIPAGEM DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS

As vesículas de membrana derivadas de macrófagos diferenciados de medula óssea, infectados ou não com *L. amazonensis* e mantidos em cultivo por um período de 9 dias, foram marcadas com anticorpos específicos para monócitos murinos (anti-F4/80 e anti-CD11b), bem como com anticorpo contra molécula apresentadora de antígeno (anti-MHC tipo II) (Figura 5).

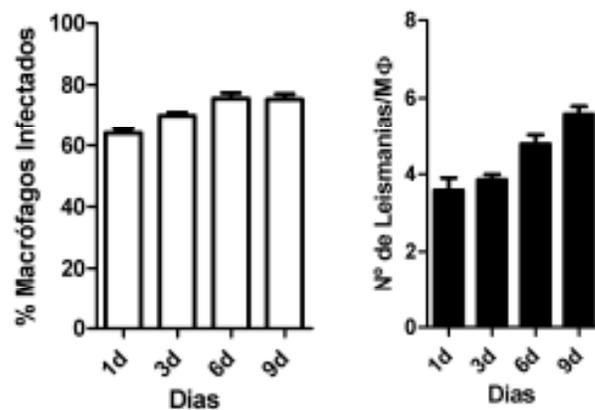


**Figura 5. Citometria de fluxo de vesículas de membrana (VMs) derivadas de macrófago marcadas com anti-CD11b, anti-F4/80 e anti-MHC tipo II.** As vesículas de membrana (VMs) foram marcadas com anti-CD11b-PE, anti-F4/80-PE-Cy5 e anti-MHC tipo II-FITC. VMs não marcadas (histograma preto). VMs marcadas (histograma linha cinza).

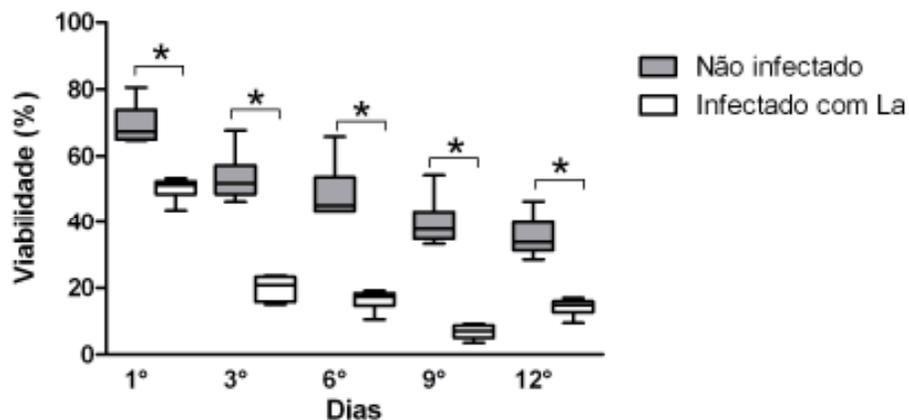
#### 7.5. CINÉTICA DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS*

A cinética da infecção nos macrófagos infectados na razão de 10 leishmanias por macrófago pode ser vista na figura 5. Após 9 dias de infecção, a taxa média de macrófagos infectados foi de 75,3% e a média de leishmanias por macrófago infectado foi 5,4.

Para aumentar o grau de infecção dos macrófagos por *L. amazonensis*, e determinar o ponto ideal de coleta de sobrenadante, foi feita uma cinética de infecção durante 1, 3, 6, 9 e 12 dias, em macrófagos infectados com leishmanias na razão de 50:1. Para avaliar a viabilidade celular, foi quantificada a redução química do *Alamar blue* (Figura 6). As absorbâncias foram lidas a cada um dos dias avaliados durante a cinética. Houve uma redução da viabilidade celular no decorrer dos dias após a infecção. A maior diferença entre a viabilidade celular dos macrófagos infectados e a dos macrófagos não infectados foi observada no dia 9. Este dia foi, portanto, escolhido para coleta do sobrenadante para obtenção de VMs, tendo em vista a possibilidade da morte celular ser, pelo menos em parte, por apoptose, acarretando o consequente acúmulo no sobrenadante de VMs apoptóticas.

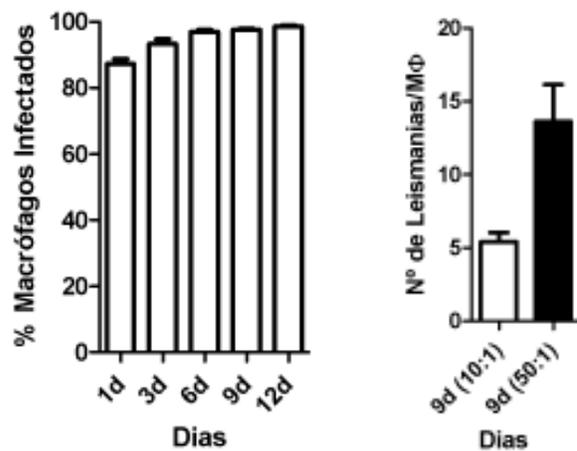


**Figura 6. Cinética de infecção de macrófagos infectados com *L. amazonensis* na razão de 10:1 durante um período de 1, 3, 6 e 9 dias pós-infecção.** Para determinar a taxa de infecção e o número de leishmanias por macrófago, as células foram cultivadas sobre lamínulas e coradas com HE. A contagem foi realizada em triplicata contando pelo menos 200 células em cada uma das lamínulas. As colunas representam a média de triplicatas e as barras verticais o desvio padrão dessas médias.



**Figura 7. Percentagem de redução química do *Alamar blue*, em relação ao controle, de macrófagos infectados com *L. amazonensis* (na razão parasito:macrófago de 50:1).** As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo; os boxes representam os percentís 25° - 75°; as linhas verticais representam os percentís 10° - 90°. \*,  $p < 0,05$ ; teste U de Mann-Whitney.

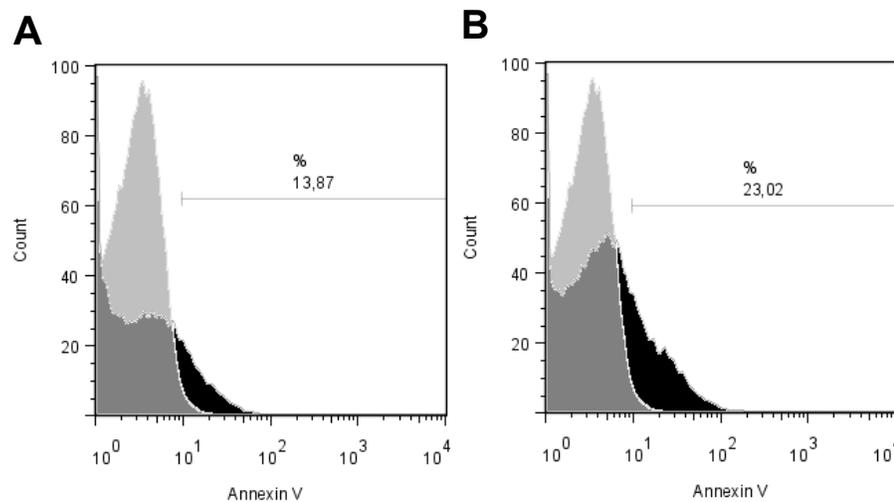
Os macrófagos também foram corados com HE e visualizados em microscópio óptico para estimar a taxa de infecção (Figuras 7 e 8). Na cinética da infecção nos macrófagos infectados na razão de 50 leishmanias por macrófago, a taxa média de macrófagos infectados foi de 98,6% no período de 9 dias, e a média de leishmanias por macrófago foi 13,6 (Figura 8). Foi observada também vacuolização citoplasmática em grande número de macrófagos, mais intensa que na infecção 10:1. Algumas células já se encontravam mortas e com seu conteúdo fragmentado (Figura 9).



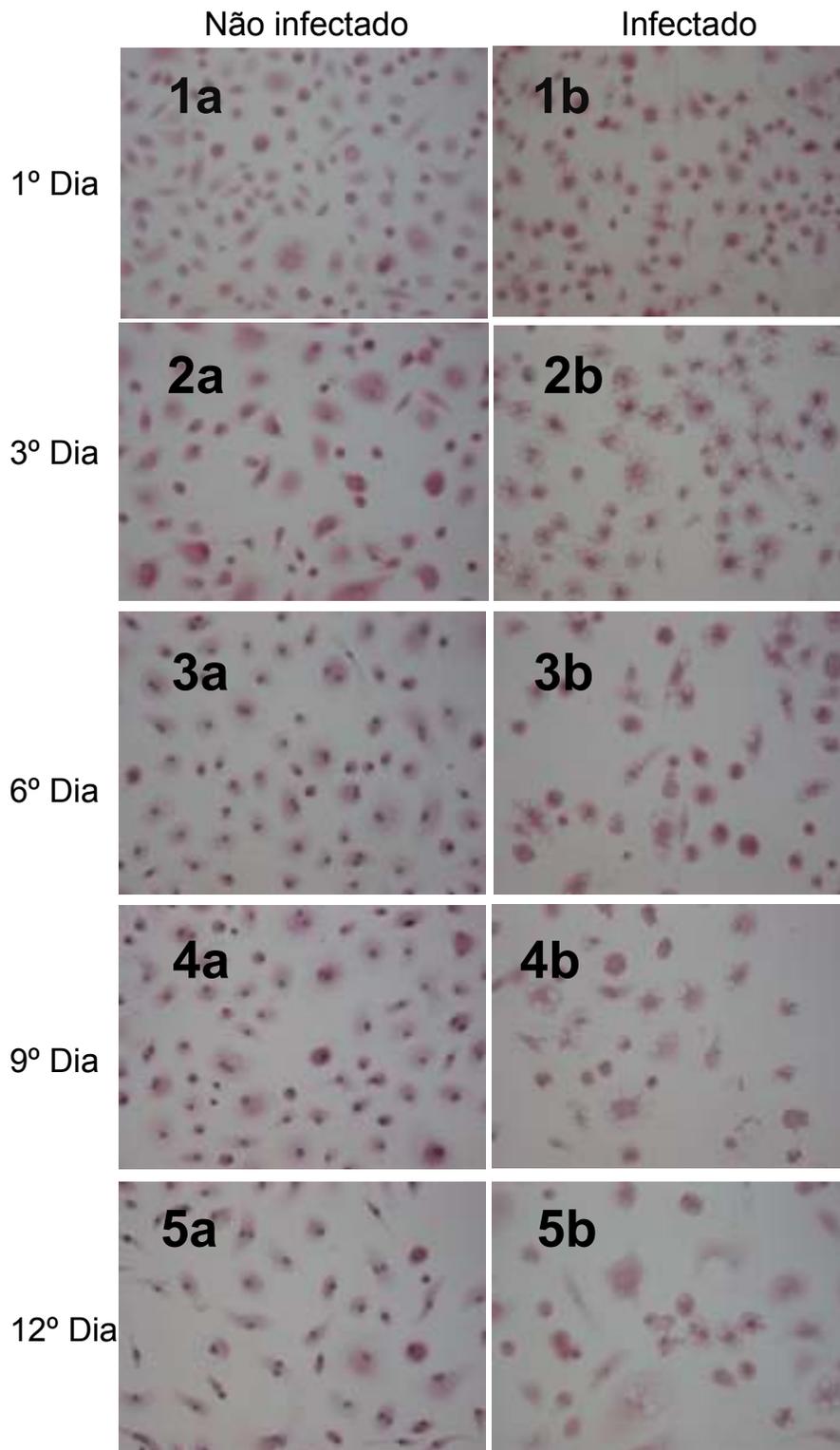
**Figura 8. Cinética de infecção de macrófagos infectados com *L. amazonensis* na razão de 50:1 durante um período de 1, 3, 6, 9 e 12 dias pós-infecção e número de macrófagos infectados na razão de 10:1 e 50:1 no dia 9 pós-infecção.** Para determinar a taxa de infecção e o número de leishmanias por macrófago, as células foram cultivadas sobre lamínulas e coradas com HE. As culturas foram realizadas em triplicata, contando-se pelo menos 200 células em cada uma das lamínulas. As colunas representam a média de triplicatas, e as barras verticais o desvio padrão dessas médias.

## 7.6 EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA NA SUPERFÍCIE CELULAR DE MACRÓFAGOS INFECTADOS

As células infectadas com *L. amazonensis* apresentaram maior exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana plasmática, evidenciada por marcação por Anexina V, do que as células não infectadas (Figura 10).



**Figura 9. Marcação com anexina V/PI de macrófagos infectados (B) ou não (A) com *L. amazonensis*.** Os macrófagos foram infectados ou não na razão de 50:1 (leishmânia:macrófago) durante um período de 9 dias pós-infecção, marcados com anexina V/PI e submetidos a citometria de fluxo. A área em preto corresponde às células marcadas e a área clara às células não marcadas.



**Figura 10. Microscopia ótica de macrófagos não infectados (1a-5a) e infectados (1b-5b) com *L. amazonensis* na razão de 50 parasitos por macrófago. As lamínulas foram coradas com HE e visualizadas em aumento de 400x. 1a, infecção por 1 dia; 2a, infecção por 3 dias; 3a, infecção por 6 dias; 4a, infecção por 9 dias; 5a, infecção por 12 dias. 1b-5b macrófagos não infectados. Pode-se notar vacuolização citoplasmática em macrófagos infectados.**

## 7.7 EFEITO DAS VESÍCULAS DE MEMBRANA DERIVADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS* SOBRE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS

A capacidade das VMs derivadas de macrófagos, infectados ou não com *L. amazonensis* (com uma razão parasito:macrófago de 50:1) por 9 dias, estimularem a produção de citocinas por macrófagos residentes peritoneais (sem estimulação com tioglicolato), estimulados ou não com LPS, no período de 48 horas, foi avaliada (Figura 11). Os cultivos que receberam VMmeio e VMLa e que não foram estimulados com LPS foram também tratados com polimixina B para descartar a possibilidade de presença de endotoxina. Foram observados resultados semelhantes aos de experimentos em que não foi utilizado o tratamento com polimixina B (dados não mostrados). Foram avaliados seis experimentos independentes.

Foi observado um certo grau de variação nos seis experimentos independentes quanto ao padrão de citocinas presentes nos sobredantes dos macrófagos tratados com as diferentes preparações de MVmeio e MVLa (Figura 11).

Os resultados mais consistentes foram observados com a IL-12p70. Enquanto concentrações de IL-12p70 acima das observadas em culturas de macrófagos não estimulados foram observadas em culturas de macrófagos tratados com VMmeio em apenas 2 de 6 experimentos, concentrações mais elevadas que as dos macrófagos não estimulados foram observadas em culturas de macrófagos tratados com VMLa em todos os seis experimentos (Figura 11A). Em todos os seis experimentos, a adição de VMLa a macrófagos não estimulados com LPS levaram a concentrações de IL-12p70 maiores do que a adição de VMmeio (Figura 11A,  $P < 0,05$ , teste de Wilcoxon pareado). Um resultado semelhante foi observado em macrófagos tratados com LPS (Figura 11B,  $P < P < 0,05$ , teste de Wilcoxon pareado). Apenas os cultivos em que foram adicionadas VMLa, na presença ou ausência de LPS, apresentaram concentrações de IL12p70 significativamente mais altas que os cultivos nos

quais não foram adicionadas VMs ( $P < 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn).

Em relação ao TNF- $\alpha$ , concentrações mais elevadas do que em culturas não estimuladas com VMs foram observados em 4 das 6 culturas de macrófagos tratadas com VMmeio, e em 3 das 6 culturas de macrófagos tratados com VMmeio e com LPS, e em todas as seis culturas de macrófagos tratados com VMLa, tanto na ausência quanto na presença de LPS (Fig. 11C e 11D). Concentrações mais elevadas de TNF- $\alpha$  em culturas de macrófagos tratados com VMLa do que em culturas de macrófagos tratados com VMmeio foram claramente observadas em apenas dois experimentos na ausência de LPS. Nos outros quatro experimentos, as concentrações foram praticamente idênticas nos cultivos contendo VMmeio e VMLa, apesar de serem marginalmente mais altas nessas últimas (Figura 11C). A diferença nas quantidades de TNF- $\alpha$  em cultivo sem LPS contendo VMLa ou VMmeio foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste de Wilcoxon pareado). Na presença de LPS, em 5 de 6 experimentos a concentração de TNF- $\alpha$  estava mais alta em cultivos contendo VMLa do que em cultivos contendo VMmeio (Figura 11D). Essa diferença não foi estatisticamente significativa. Apenas os cultivos em que foram adicionadas VMLa, na presença ou ausência de LPS, apresentaram concentrações de TNF- $\alpha$  significativamente mais altas que os cultivos nos quais não foram adicionadas VMs ( $P < 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn).

Quanto às concentrações de IL-6 (Fig. 11E e 11F) e IL-10 (Fig. 11G e 11H), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos com VMmeio e VMLa, na presença ou ausência de LPS, apesar de em 3 dos 6 experimentos ter ocorrido uma produção nitidamente maior de IL-6 em cultivos de macrófagos estimulados com LPS contendo VMLa do que nos contendo VMmeio (Fig. 11F).

A adição de VMLa ou de VMmeio não acarretou diferenças de concentração de IL-6 estatisticamente significantes em relação a cultivos sem adição de VMs, seja na presença ou ausência de LPS ( $P > 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn).

Houve pequenos aumentos nas concentrações de IL-10 nos cultivos de macrófagos não estimulados com LPS quando tratados com VMmeio e VMLa (em 4 dos 6 experimentos o aumento foi menor que 10 pg tanto para cultivos com VMLa quanto para cultivos com VMmeio; em todos os seis experimentos o aumento foi menor que 22 pg nos cultivos com VMLa). Estes aumentos foram estatisticamente significantes apenas para os cultivos contendo VMmeio ( $P < 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn).

Foram vistas concentrações mais elevadas de IL-1 $\beta$  quando os macrófagos foram tratados com VMLa do que quando tratados com VMmeio, na ausência (Fig. 11I) ou presença (Fig. 11J) de LPS. Apesar da significância estatística, em um experimento na ausência de LPS, e em um na presença de LPS, essa diferença foi muito pequena (menor que 1 %). Houve aumento na produção de IL-1 $\beta$  nos cultivos em que foram adicionadas VMLa, tanto na presença ( $P < 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn) quanto na ausência ( $P < 0,01$ , teste de Friedman com pós-teste de Dunn) de LPS, e nos cultivos onde foi adicionado VMmeio na ausência de LPS ( $P < 0,05$ ; teste de Friedman com pós-teste de Dunn).

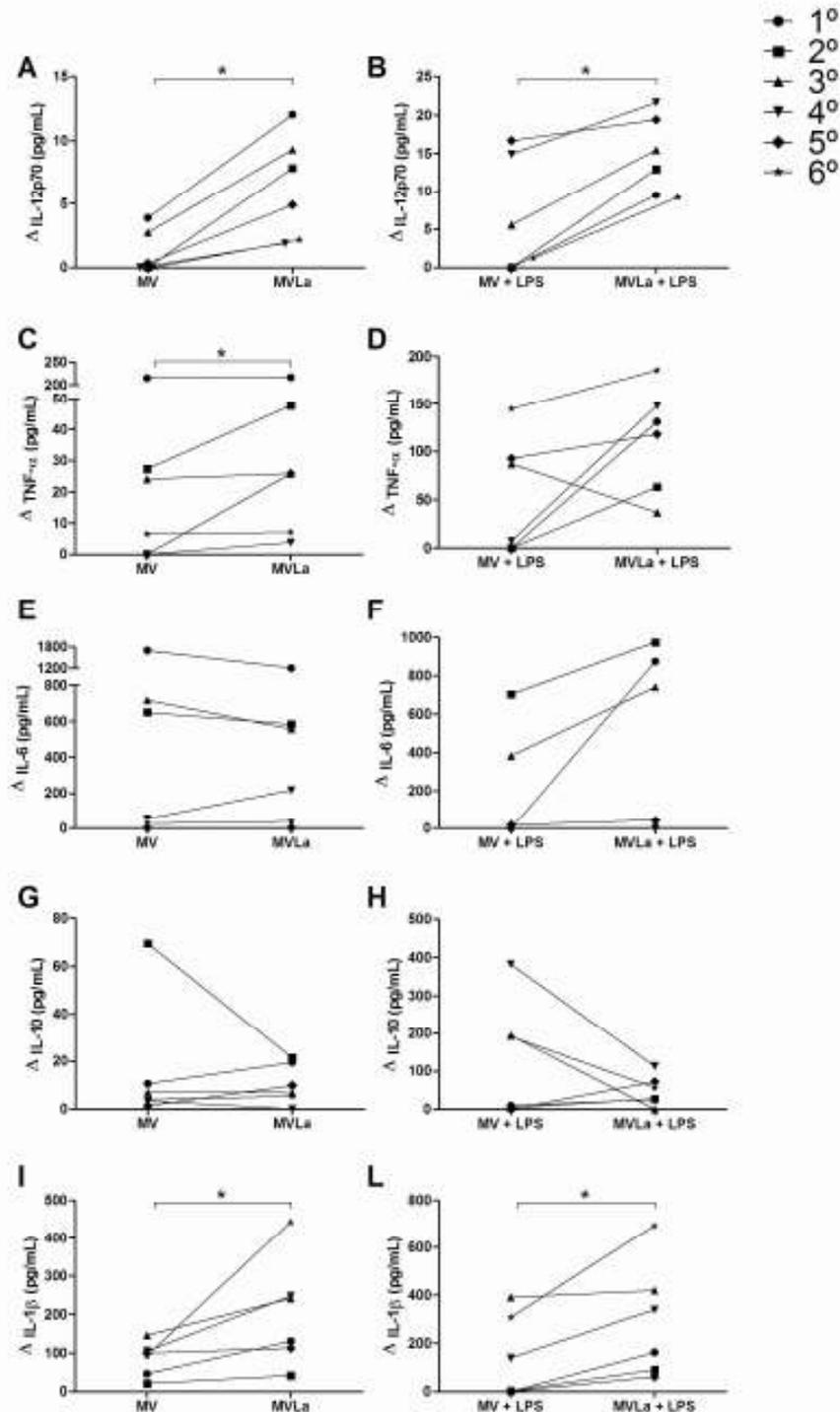


Figura 11. Efeito das vesículas de membrana derivadas de macrófagos, infectados (VMLa) ou não (VMmeio) com *L. amazonensis* (em uma razão parasito:macrófago de 50:1), sobre a produção de IL-12p70 (A, B), TNF- $\alpha$  (C, D), IL-10 (E, F), IL-6 (G, H) e IL-1 $\beta$  (I, J), em macrófagos coestimulados (B, D, F, H, J) ou não (A, C, E, G, I) com LPS no período de 48 horas. Os pontos e linhas representam as médias de cada experimento. Os grupos foram avaliados pelo teste de Wilcoxon pareado. \*,  $p \leq 0,05$ .

## 8. DISCUSSÃO

A infecção de macrófagos é uma condição *sine qua non* para o estabelecimento da infecção leishmaniótica no hospedeiro vertebrado e, de fato, para a perpetuação da espécie parasitária (RITTING & BOGDAN, 2000; SACKS & SHER, 2002). Consistente com essa particularidade do ciclo vital do parasito, durante a infecção do animal vertebrado, macrófagos intensamente infectados são observados (SILVEIRA, LAINSON, CORBETT, 2005). Neste trabalho de dissertação foi investigada uma possível sinalização a partir destes macrófagos infectados para macrófagos adjacentes, através de VMs, antes de estes últimos serem infectados, os preparando para montar uma resposta mais eficaz contra a infecção, ou, pelo contrário, tornando-os mais suscetíveis à infecção, como um mecanismo de escape do parasito. Um primeiro passo deste trabalho, portanto, foi determinar se, no sistema *in vitro* utilizado, VMs eram formadas.

A presença de VMs foi, de fato, demonstrada, através da citometria de fluxo, em sobrenadante de macrófagos marcados com PKH26 (Figura 1) e submetidos a um estímulo com ELA. Resultados similares foram descritos em sobrenadante de neutrófilos marcados com PKH26 (DUARTE *et al.*, 2012). Além dessa demonstração, a microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo permitiu a visualização da VMs e observação de sua heterogeneidade em tamanho. Esse método de visualização foi descrito literatura como capaz de evidenciar a presença de VMs (BHATNAGAR *et al.*, 2007).

Como neste trabalho foram utilizadas células de medula óssea tratadas com GM-CSF por 8 dias de cultivo, fez-se necessário demonstrar a eficácia da aplicação desse protocolo, nas condições existentes no laboratório, em levar à diferenciação das células em macrófagos. Uma proporção de mais de 87% das células pode ser marcada com anticorpos contra CD11b e F4/80 (Figura 3), confirmando a presença de uma população de macrófagos maduros (AUSTYN & GORDON, 1981; LEENEN *et al.*, 1994).

VMs apresentam diferentes composições de membrana, a depender da célula da qual foram originadas (revisto por THERY *et al.*, 2009). As VMs presentes nos sobrenadantes de macrófagos neste trabalho de dissertação apresentaram também os marcadores de superfície CD11b e F4/80, além de MHC classe II, demonstrando uma origem macrofágica.

Os macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram avaliados também por microscopia eletrônica de transmissão, através da qual foi possível a visualização da liberação de VMs por vesiculação da célula infectada após o período de nove dias de cultivo. Uma liberação similar de VMs em células dendríticas tratadas com LPS após 6 horas de cultivo foi descrita por Obregon e colaboradores (2006).

Em células em estado apoptótico e de ativação celular ocorre uma maior liberação de VMs (THERY *et al.*, 2009). Realizamos a cinética de infecção para determinar qual o melhor momento para a coleta de sobrenadante rico em VMs, usando como parâmetro para determinar esse momento a diferença na redução de números de células em culturas de macrófagos infectados e não infectados, partindo do princípio que a redução possa decorrer de apoptose. Não foi satisfatório o índice de infecção na relação 10:1. Em macrófagos infectados com *L. amazonensis* em uma relação 50:1 observou-se um maior número de leishmanias por macrófago e uma maior taxa de infecção, o que poderia ser importante para uma liberação mais intensa de VMs. Entretanto, mesmo na proporção de 50:1, o número de leishmanias por macrófago foi aquém do esperado. Uma possível razão para isso pode ter sido a temperatura do cultivo, já que foi descrito uma maior taxa de infecção em temperatura de 34 a 35° C (SACKS, BARRAL & NEVA, 1983), mais baixa do que a utilizada (37° C) no trabalho aqui descrito.

Foi observada uma variação das concentrações de citocinas em sobrenadantes de macrófagos estimulados com citocinas entre os experimentos. Este fato pode estar relacionado a variações nos lotes de VMs produzidos para realização de cada experimento, já que é observado mesmo após a subtração dos valores obtidos apenas com o meio ou apenas com LPS. Para reduzir a influência dessa variação inter-experimento, que poderia estar

reduzindo a significância das diferenças observadas, as análises estatísticas foram realizadas com o teste de Friedman seguido pelo pós-teste de Dunn, e pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Estes testes levam em consideração o fato de um conjunto de dados virem de um determinado experimento, enquanto outros conjuntos vêm de outros experimentos.

Observou-se, neste trabalho de dissertação, um aumento da produção de IL-12p70 por macrófagos peritoneais residentes (colhidos sem estímulo com tioglicolato) ao serem tratados com VMLa, na ausência ou na presença de LPS, diferindo do observado em macrófagos tratados com VMmeio e em macrófagos não tratados. Este achado contrapõe-se ao fato de ter sido relatado que um dos mecanismos de resistência ao sistema imune da *L. amazonensis* é a inibição da produção de IL-12 nos macrófagos infectados. Assim, a infecção de macrófagos derivados da medula óssea por *L. amazonensis* leva à inibição de estímulos necessários à expressão e à produção de IL-12 (RUHLAND & KIMA, 2009).

Entretanto, a IL-12 produzida em decorrência da interação com VMs derivadas de macrófagos infectados com macrófagos não infectados poderia promover uma diferenciação de linfócitos Th0 para linfócitos Th1, os quais liberariam IFN- $\gamma$ , resultando em uma resposta do tipo Th1 que conferiria resistência à infecção leishmaniótica (HEINZEL *et al.*, 1993; SYPEK *et al.*, 1993). Neste trabalho foi utilizado o ELISA específico para a p70 que detecta níveis do heterodímero biologicamente ativo, pois a IL-12 é uma citocina com uma estrutura heterodimérica que consiste em duas subunidades p35 e p40 e juntas formam uma proteína de 70-75-kDa (p70) (SCHOENHAUT *et al.*, 1992).

Um aumento estatisticamente significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi observado nos sobrenadantes de macrófagos tratados com VMLa, e não nos tratados com VMmeio, com exceção do aumento de IL-1 $\beta$  em cultivos de macrófagos sem LPS tratados com VMmeio. Além disso, as concentrações dessas citocinas presentes em sobrenadantes de macrófagos tratados com VMLa foram maiores que as presentes em sobrenadantes de macrófagos tratados com VMmeio, com exceção das concentrações de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de macrófagos na presença de LPS.

A IL-1 $\beta$  está relacionada à resistência do hospedeiro à infecção leishmaniótica, através do estímulo do receptor de IL-1 e ativação da proteína adaptadora MyD88, levando à produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013). Desta forma o aumento na produção de IL-1 $\beta$  pode ser importante no controle da infecção.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos e é importante no controle da infecção por *Leishmania* (LIEW *et al.*, 1990). Em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com a forma mucosa grave, há concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  e de INF- $\gamma$ , os quais estão associadas a uma resposta Th1 exacerbada (BACELLAR *et al.*, 2002).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória principalmente produzida por células T, células dendríticas e macrófagos. Tem sido relatado que a IL-6 não é necessária para uma forte resposta Th1 (MOSKOWITZ, *et al.*, 1997) e que, na presença de TGF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-23, acarreta a diferenciação de linfócitos Th0 em linfócitos Th17 (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007;ZHOU *et al.*, 2007). Em camundongos geneticamente susceptíveis (BALB/c), deficientes para IL-6, entretanto, não houve diferença no tamanho da lesão e carga parasitária na infecção por *L. major* (TITUS *et al.*, 2001). Não observamos diferença estatisticamente significativa na produção de IL-6 quando os macrófagos residentes não infectados foram tratados com VMmeio ou VMLa.

A produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por macrófagos está associada a um fenótipo do tipo M1. O perfil de macrófagos M1 é responsável por polarizar a resposta imune em Th1, produzindo IL-12 e mantendo uma produção baixa de IL-10. Os principais estímulos que favorecem a ativação e polarização em macrófagos M1 são o LPS e o IFN- $\gamma$  (MANTOVANI *et al.*, 2004). Os resultados aqui descritos indicam que as VMs, particularmente as oriundas de macrófagos infectados por *Leishmania*, induzem a diferenciação de macrófagos para o tipo M1, já que os macrófagos M2 expressam grandes quantidades de IL-10 (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Exossomos derivados de *L. donovani* exacerbam a infecção modulando uma resposta anti-inflamatória pela inibição da produção de TNF- $\alpha$  e de IL-8 e

aumento de IL-10 em monócitos humanos (SILVERMAN *et al.*, 2010). No presente modelo, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de macrófagos tratados com VMmeio e o grupo dos tratados com VMLa quanto à produção de IL-10. Além disso, as VMLa, diferentemente das VMmeio, não aumentaram significativamente a concentração de IL-10 no sobrenadante dos macrófagos, o que enfraquece a hipótese que essas VMs tornariam os macrófagos mais permissivos à infecção.

É possível que macrófagos não infectados, ou estimulados por condições inerentes ao cultivo *in vitro* ainda por definir, ou mesmo espontaneamente *in vivo*, liberem constantemente VMs que tenderiam a reduzir um estado inflamatório, como forma de manter a homeostase, através de uma produção basal de IL-10. Entretanto, esta hipótese não explica porque as VMmeio estimulariam também a produção da citocina proinflamatória IL-1 $\beta$ .

Um dos mecanismos que podem explicar a capacidade das VMs em promover uma resposta proinflamatória é a sua ligação a moléculas com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Essas moléculas são ligantes para receptores de células apresentadoras de antígeno, como os receptores do tipo Toll (TLRs) e ativam as células que possuem esse receptor. Poderia, portanto, ocorrer uma ligação das VMs derivadas de macrófagos infectados a TLRs de macrófagos não infectados, os ativando e incrementando mecanismos de defesa relacionados à imunidade inata que, por sua vez, iniciariam uma resposta adaptativa protetora do tipo Th1. Macrófagos produzem vesículas de membrana quando há dano tecidual que levam a ativação dessas células ou de células dendríticas, resultando na secreção de TNF- $\alpha$  e outros mediadores proinflamatórios parcialmente dependentes de TLR4 (THOMAS & SALTER, 2010). Padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs) também poderiam estar relacionados ao mecanismo de ação, aqui descrita, das VMs. As VMs podem conter DAMPs das células que se encontram em apoptose ou necrose. Receptores de lectina C presentes em células mielóides e, principalmente, em fagócitos mononucleares reconhecem DAMPs que são expressos pelas células mortas ou em processo de morte e provavelmente podem estar presentes nas VMs (SANCHO & REIS E SOUZA, 2013). Entre os DAMPs encontramos proteínas de choque térmico,

glicoproteínas e lipoproteínas e o HMGB1, os quais, assim como os PAMPs, são reconhecidos por receptores do tipo TLR4. Além disso, outros componentes como ATP, cristais de ácido úrico, cristais de colesterol e espécies reativas de oxigênio também são reconhecidos por receptores NLRP3 (DUBANIEWICZ, 2013). Estes receptores podem reconhecer essas moléculas, ativando os macrófagos e induzir uma resposta inflamatória. Foi relatado que a acidose gerada por DAMPs em monócitos de linhagem humanos (THP-1) ativa o inflamassoma NLRP3, aumentando a produção de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  (EDYE *et al.*, 2013), o que pode ocorrer também em infecções.

Em estado de apoptose tardio, as células expõem DAMPs que podem atuar como ponto de partida de uma resposta inflamatória (SANCHO & REIS E SOUZA, 2013). Nesta dissertação foi vista, por microscopia ótica, vacuolização, fragmentação e rompimento celular mais intenso em macrófagos infectados com *L. amazonensis* do que nos macrófagos não infectados particularmente após o nono dia de infecção. A vacuolização encontrada nos macrófagos infectados é devida a formação dos vacúolos parasitóforos, onde as formas amastigotas de *Leishmania* se replicam (CHANG, 1983), mas a fragmentação e o rompimento celulares poderiam ser decorrente da apoptose. Em concordância com essa hipótese, foi observada uma ligação mais intensa de anexina V em macrófagos infectados do que nos não infectados por *L. amazonensis*, indicando que as células infectadas podem estar em apoptose tardia.

As informações obtidas pela realização deste trabalho de dissertação poderiam ser úteis para o desenvolvimento de uma vacina. A indução de uma resposta polarizada Th1 favorece o desenvolvimento de uma resposta imune protetora na leishmaniose. Antígenos de *Leishmania* encapsulados em lipossomas têm um efeito protetor maior do que quando administrados sozinhos (BHOWMICK, RAVINDRAN & ALI, 2007; BADIEE *et al.*, 2009). Trabalhos apontam a presença de MHC de classe I e II, bem como a presença de moléculas coestimuladoras (CD86 e CD80) em VMs derivadas de células apresentadoras de antígenos. O fato de carrear essas moléculas imunoestimuladoras as tornam capazes de ativar células T, levando à proliferação destas e a uma resposta imune antígeno específica (RAPOSO *et*

*al.*, 1996; ZITVOGEL *et al.*, 1998). Foi descrito, por exemplo, que micropartículas e exossomos derivados de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* são capazes de estimular a resposta de células T CD4<sup>+</sup> via apresentação de antígenos micobacterianos por MHC classe II (RAMACHANDRA *et al.*, 2010). Além disso, exossomos derivados de células dendríticas pulsadas com antígeno de *Leishmania* são capazes de conferir proteção contra infecção por *L. major* (Schnitzer *et al.*, 2010).

Como mostrado neste trabalho, VMs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* também podem desempenhar um papel na modulação da resposta imune e serem objeto de investigação sobre possíveis proteínas imunoestimuladoras. É interessante comentar que macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* (BCG) liberam exossomos com capacidade de gerar resposta imune pró-inflamatória *in vitro* e *in vivo* e contêm proteínas da micobactéria (BHATNAGAR *et al.*, 2007; BHATNAGAR & SCHOREY, 2007). Esses estudos reforçam a capacidade imunoestimuladora das vesículas derivadas de células infectadas, induzindo uma resposta pró-inflamatória (HOSSEINI *et al.*, 2013).

Esse fato, e a demonstração no trabalho desta dissertação de que VMs obtidas de cultura e macrófagos é capaz de induzir a produção de IL-12, uma citocina que promove uma resposta Th1 protetora na leishmaniose tegumentar, evidencia o potencial das de VMs como as obtidas aqui como candidatas a vacinas ou imunoterápicos em casos resistentes ao tratamento.

O custo da possível produção de VMs para uma futura vacina é elevado, sendo necessário cultivo de células em larga escala. A identificação e o uso como adjuvantes de proteínas presentes nas VMs de macrófagos infectados com *L. amazonensis* que possam ter um efeito imunoestimulador pode ser uma alternativa ao uso das VMs.

Em relação ao uso das VMs alogênicas como agentes imunoprolifáticos ou imunoterapêuticos, essas vesículas carregam moléculas de MHC que induziriam uma reação alogênica. As reações imune alogênicas são mais fortes até mesmo que as reações heterólogas, e poderiam interferir com a resposta imune desejada. Uma possibilidade de produzir lotes de VMs que poderiam ser

usados em diferentes indivíduos, seria o uso de VMs originada de um mamífero de outra espécie. O estímulo de macrófagos por VMs de origem macrófágica não deve sofrer restrição pelo MHC, já que macrófagos, diferentemente de linfócitos T, não reconhecem MHC. Condizente com a possibilidade de uso de VMs não singeneicas como agentes imunoestimuladores, foi visto que exossomos de células dendríticas pulsadas com antígenos de *Toxoplasma gondii* induzem resposta protetora tanto em camundongos singeneicos como em alogênicos (BEAUVILLAIN *et al.*, 2007).

Em situações em que não se deseja induzir uma resposta imune ativa, como no caso de hormonioterapias e soroterapias, é obviamente indesejável o reconhecimento pelo sistema imune de antígenos heterólogos irrelevantes. Entretanto, se o objetivo é exatamente induzir uma resposta imune, pode ser proveitoso investigar se uma resposta contra antígenos macrófágicos heterólogos, presentes nas VMs, teria um efeito inibidor ou estimulador sobre a resposta imune que se pretende induzir.

Foi claramente demonstrada neste trabalho de dissertação a presença de VMs de origem macrófágica, em cultivo de macrófagos infectados, que são capazes de modificar o padrão das citocinas produzidas por macrófagos não infectados. Entretanto, a liberação de VMs pela própria *Leishmania* foi descrita (SILVERMAN *et al.*, 2010). No presente trabalho não foi determinada a natureza das VMs com atividade imunoestimuladora, seja quanto à origem subcelular (se são micropartículas ou exossomas; os dados de citometria de fluxo parecem afastar a possibilidade de que as VMs aqui estudadas sejam os mais avantajados corpos apoptóticos), quanto à origem celular (se são VMs de macrófagos ou de *Leishmania*). Estudos adicionais são necessários para esclarecer esses pontos.

## 9. PERSPECTIVAS

a. Investigar se as vesículas de membrana derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* promovem a proteção em modelo experimental murino

b. Identificar proteínas antigênicas de *L. amazonensis* possivelmente presentes nestas vesículas

c. Investigar a origem das vesículas de membrana (se macrofágica ou leishmaniótica), utilizando esferas magnéticas (“beads”) ligadas a anticorpos em experimentos de depleção de VMs com atividade imunoestimuladora.

d. Investigar se as vesículas de membrana derivadas de macrófagos heterólogos infectados com *L. amazonensis* promovem proteção contra infecção leishmaniótica em modelo experimental murino

## 10. CONCLUSÃO

VMs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressam MHC II e ativam outros macrófagos para a produção de IL-12 e IL-1 $\beta$ , justificando futuros estudos sobre o uso dessas vesículas como agentes biotecnológicos em protocolos para indução de imunidade do tipo Th1.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 942–949, 2007.

ADMYRE, C. et al. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1772–1781, 2006.

ADMYRE, C. et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1969–1978, 2007.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, pt 18, p. 2993–3002, 1999.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **European Journal of Immunology**, v. 11, n. 10, p. 805–815, 1981.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.

BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BACELLAR O.; M., C. E. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.

BADIEE, A. et al. The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63). **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 362–369, 2009.

BEAUVILLAIN, C. et al. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14-15, p. 1614–1622, 2007.

BELLONE, M. et al. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 11, p. 5391–5399, 1997.

BENAMEUR, T.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; MARTÍNEZ, M. C. Therapeutic potential of plasma membrane-derived microparticles. **Pharmacological Reports: PR**, v. 61, n. 1, p. 49–57, 2009.

BERGSMEDH, A. et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6407–6411, 2001.

BEYER, C.; PISETSKY, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 1, p. 21–29, 2010.

BHATNAGAR, S.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 35, p. 25779–25789, 2007.

BHATNAGAR, S. et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234–3244, 2007.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response. **Vaccine**, v. 25, n. 35, p. 6544–6556, 2007.

BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, 2010.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 2006. v. 1d, 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2007. v. 2d.

CACHO, E. DEL et al. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. **Vaccine**, v. 29, n. 21, p. 3818–3825, 2011.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 113, 2005.

CARRERA, L. et al. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 2, p. 515–526, 1996.

CARVALHO, A. K. et al. *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 8-9, p. 395–403, 2012.

CARVALHO, E. M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 423–424, 2012.

CHANG, K. P. Leishmania donovani-macrophage binding mediated by surface glycoproteins/antigens: characterization in vitro by a radioisotopic assay. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 4, n. 1-2, p. 67–76, 1981.

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of Leishmania donovani in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345–355, 1984.

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

CLINE, A. M.; RADIC, M. Z. Murine lupus autoantibodies identify distinct subsets of apoptotic bodies. **Autoimmunity**, v. 37, n. 2, p. 85–93, 2004.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

CONDE-VANCELLS, J.; FALCON-PEREZ, J. M. Isolation of urinary exosomes from animal models to unravel noninvasive disease biomarkers. **Methods in Molecular Biology**, v. 909, n. 4, p. 321–340, 2012.

COOPER, A. M. et al. The role of interleukin-12 in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunology**, v. 84, n. 3, p. 423–432, 1995.

CULLEY, F. J. et al. C-reactive protein binds to a novel ligand on Leishmania donovani and increases uptake into human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 12, p. 4691–4696, 1996.

DARDALHON, V. Fractionation Analysis of the Endosomal Compartment During Rat Reticulocyte Maturation. **Cell Biology International**, v. 26, n. 8, p. 669–678, 2002.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DUARTE, T. A. et al. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. **Tuberculosis**, v. 92, n. 3, p. 218–225, 2012.

DUBANIEWICZ, A. Microbial and human heat shock proteins as “danger signals” in sarcoidosis. **Human Immunology**, 2013.

EDER, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 543–553, 2009.

EDYE, M. E. et al. Acidosis Drives Damage-associated Molecular Pattern (DAMP)-induced Interleukin-1 Secretion via a Caspase-1-independent Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 42, p. 30485–30494, 2013.

EKEN, C. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with maturation of monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 817–824, 2008.

FÉVRIER, B.; RAPOSO, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 415–421, 2004.

GIRI, P. K. et al. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. **Proteomics**, v. 10, n. 17, p. 3190–3202, 2010.

GIRI, P. K.; SCHOREY, J. S. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2461, 2008.

GONZALES, P. A. et al. Isolation and purification of exosomes in urine. **Methods in Molecular Biology**, v. 641, p. 89–99, 2010.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

HASSANI, K.; OLIVER, M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophages exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2013.

HAWARI, F. I. et al. Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 1297–1302, 2004.

HEIJNEN, H. F. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.

HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, p. 1505–1509, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HOLMGREN, L. et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. **Blood**, v. 93, n. 11, p. 3956–3963, 1999.

HOSSEINI, H. M. et al. The role of exosomes in infectious diseases. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 29–37, 2013.

HRISTOV, M. et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2761–2766, 2004.

HSIEH, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547–549, 1993.

JOHANSSON, S. M. et al. Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes. **Immunology**, v. 123, n. 4, p. 491–499, 2008.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses? **Science**, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 2008.

KHAN, S. et al. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e46737, 2012.

LASKAY, T. et al. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 183–191, 2008.

LEENEN, P. J. et al. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 5–19, 1994.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990.

LIMA, L. G. et al. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer Letters**, v. 283, n. 2, p. 168–175, 2009.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2009.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 206–224, 2004.

MECKES, D. G.; RAAB-TRAUB, N. Microvesicles and viral infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 24, p. 12844–12854, 2011.

MOSKOWITZ, N. H.; BROWN, D. R.; REINER, S. L. Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2448–2450, 1997.

O'NEILL, H. C.; QUAH, B. J. C. Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory. **Science Signaling**, v. 1, n. 6, p. pe8, 2008.

OBREGON, C. et al. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 6, p. 2127–2136, 2006.

OGAWA, Y. et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 13–23, 2011.

OSORIO Y FORTÉA, J. et al. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 66–74, 2007.

PENG, P.; YAN, Y.; KENG, S. Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity. **Oncology Reports**, v. 25, n. 3, p. 749–762, 2011.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PRADO, N. et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1519–1525, 2008.

PRINA, E. et al. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 2, p. 315–325, 2004.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4311–4316, 1990.

QU, Y. et al. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1913–1925, 2007.

QU, Y. et al. P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p. 5052–5062, 2009.

RAMACHANDRA, L. et al. Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5116–5125, 2010.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161–1172, 1996.

REAL, F.; MORTARA, R. A; RABINOVITCH, M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e905, 2010.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

RIZVI, F. S. et al. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. **European Journal of Immunology**, v. 18, n. 3, p. 473–476, 1988.

RUHLAND, A.; KIMA, P. E. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania*

amazonensis promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 1, p. 28–36, 2009.

SACKS, D. L.; BARRAL, A.; NEVA, F. A. Thermosensitivity patterns of Old vs. New World cutaneous strains of *Leishmania* growing within mouse peritoneal macrophages in vitro. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 2, p. 300–304, 1983.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

SANCHO, D.; REIS E SOUSA, C. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 46–52, 2013.

SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 12, p. 965–975, 2002.

SCHNITZER, J. K. et al. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. **Vaccine**, v. 28, n. 36, p. 5785–5793, 2010.

SCHOENHAUT, D. S. et al. Cloning and expression of murine IL-12. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 11, p. 3433–3440, 1992.

SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic**, v. 9, n. 6, p. 871–881, 2008.

SILVA, V. M. G. et al. Enhancement of experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania* molecules is dependent on interleukin-4, serine protease/esterase activity, and parasite and host genetic backgrounds. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1236–1243, 2011.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525–534, 2005.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 6, p. 842–852, 2010.

SILVERMAN, J. M. et al. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5011–5022, 2010.

SKOKOS, D. et al. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3037–3045, 2003.

SYPEK, J. P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, p. 1797–1802, 1993.

TALAMÁS-ROHANA, P. et al. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4817–4824, 1990.

TEIXEIRA, M. C. A. et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 88, n. 11, p. 963–968, 2002.

THÉRY, C. et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of heat shock protein hsc73. **Journal of Cell Biology**, v. 147, p. 599–610, 1999.

THÉRY, C. et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7309–7318, 2001.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.

THÉRY, C et al.. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581–593, 2009.

THOMAS, L. M.; SALTER, R. D. Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially dependent on TLR4. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3740–3749, 2010.

TITUS, R. G. et al. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5189–5192, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 251–276, 1995.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3725–3729, 1993.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. DE. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

WALKER, J. D.; MAIER, C. L.; POBER, J. S. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 3, p. 1548–1559, 2009.

WALTERS, S. B. et al. Microparticles from mycobacteria-infected macrophages promote inflammation and cellular migration. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 669–677, 2013.

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

WUBBOLTS, R. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 10963–10972, 2003.

ZAL, T.; VOLKMANN, A.; STOCKINGER, B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 6, p. 2089–2099, 1994.

ZHANG, Y. et al. Microparticles released by *Listeria monocytogenes*-infected macrophages are required for dendritic cell-elicited protective immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 9, n. 6, p. 489–496, 2012.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 967–974, 2007.

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

ZWAAL, R. F.; SCHROIT, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, v. 89, n. 4, p. 1121–1132, 1997.

1 **Extracellular Vesicles from *Leishmania*-infected Macrophages Confer**  
2 **an Anti-infection Profile to Naïve Macrophages**

3

4 Short title: Proinflammatory Extracellular Vesicles from *Leishmania*-infected  
5 Macrophages

6

7 André Cronemberger-Andrade<sup>1</sup>, Luciana Aragão-França<sup>1</sup>, Cintia Figueiredo de Araujo<sup>1</sup>,  
8 Viviane Junqueira Rocha<sup>1</sup>, Cláudio P. Figueiras<sup>1</sup>, Pablo R. Oliveira<sup>1</sup>, Luiz A. R. Freitas,  
9 Patrícia S. T. Veras<sup>1</sup>, Lain Pontes-de-Carvalho<sup>1</sup>

10

11 <sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil

12

13 **CORRESPONDING AUTHOR:** Lain Carlos Pontes de Carvalho - Rua Waldemar  
14 Falcão 121, 40296-710 Salvador, Brazil. Telephone: +55 71 31562290. FAX: +55 71  
15 31562272. E-mail: [lain.carvalho@gmail.com](mailto:lain.carvalho@gmail.com).

16

17 **Abstract**

18 Background

19 Extracellular vesicles (EVs) are structures with a phospholipid bilayer membrane and  
20 100-1000 nm in diameter. These vesicles are released from cells upon activation of  
21 surface receptors and apoptosis. The production of EVs by dendritic cells, mast cells,  
22 macrophages, and B and T lymphocytes has been extensively reported in the literature.  
23 They also express MHC class II and other membrane surface molecules and carry

24 antigens. The aim of this study was to investigate the role of EVs from *Leishmania*-  
25 infected macrophages as immune modulatory particles.

26

#### 27 Methodology/Principal Findings

28 In this work it was shown that BALB/c mouse bone marrow-derived macrophages, when  
29 infected *in vitro* with *Leishmania amazonensis*, release slightly larger amounts of 100-  
30 300 nm-diameter extracellular vesicles (EVs) than non-infected macrophages. The EVs  
31 were characterized by flow cytometry, electron microscopy and by membrane staining  
32 of the cells from which they were derived. They were spherical and had diameters of  
33 150 to 300 nm. The incubation of naïve macrophages with these EVs for 48 hours led to  
34 a statistically significant increase in the production of IL-12, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

35

#### 36 Conclusions/Significance

37 EVs derived from macrophages infected with *L. amazonensis* induce other  
38 macrophages, which *in vivo* could be bystander cells, to produce the proinflammatory  
39 cytokines IL-12, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . This could contribute both to modulate the immune  
40 system in favor of a Th1 immune response and to the elimination of the *Leishmania*,  
41 leading, therefore, to the control the infection. It has been reported in the literature that  
42 EVs may carry intracellular microorganism antigens. Since it is shown in the present  
43 work that they induce the production of a Th1 immune response-promoting cytokine—  
44 i.e. IL-12, the possibility of their use as an anti-leishmaniasis vaccine is discussed in this  
45 article.

46

47

48

49

50

## 51 **Keywords**

52 Macrophage, extracellular vesicle, Leishmania, *Leishmania amazonensis*,  
53 proinflammatory, IL-12, IL-1, TNF, microparticle

54

## 55 **Authors Summary**

56 Leishmaniases are a group of diseases—each one individually called leishmaniasis—  
57 that are caused by the protozoan *Leishmania*. They affect millions of people and  
58 thousands of dogs in tropical and mediterranean countries. Macrophages are the main  
59 cellular hosts of *Leishmania* in the mammalian host, where it is an obligatorily  
60 intracellular parasite. In this work, it is shown that mouse bone marrow-derived  
61 macrophages, when infected *in vitro* with *Leishmania*, release larger amounts of small  
62 (no larger than 300 nm) extracellular vesicles (EVs) than non-infected macrophages.  
63 These vesicles induce in other macrophages the production of some cell hormones,  
64 named cytokines, that are involved with protection of the macrophage against infection  
65 and with the development of a protective immune response against the parasite. The  
66 possibility of their use as an anti-leishmaniasis vaccine is discussed.

67

68

## 69 Introduction

70 Leishmaniases are a disease complex caused by about 21 trypanosomatid protozoa of  
71 the genus *Leishmania* [1–3]. Parasites of that genus have been co-evolving with their  
72 mammals and insects hosts for thousands of years. It is not surprising, therefore, that  
73 they are well adapted to these hosts and vectors, persisting and replicating in tissues,  
74 subverting the immune response of the vertebrate host, and spreading to other hosts of  
75 the same or another species. In the mammalian host, the *Leishmania* survive and  
76 replicates as amastigotes, mainly inside macrophages [4].

77

78 The immunity to *Leishmania* is associated with a specific Th1 immune response [5,6].  
79 The release of IL-12 by macrophages and dendritic cells leads to production of IFN- $\gamma$  by  
80 NK cells and differentiation of Th0 cells into Th1 cells, which also release IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$   
81 provides a key stimulus for the development of macrophage resistance to most  
82 intracellular pathogens, among which are the *Leishmania* [7,8].

83

84 One of the most important features of the immune response to *Leishmania* in mice is  
85 the polarization of CD4<sup>+</sup> T cells into two subpopulations: Th1, which produce IFN- $\gamma$ , and  
86 Th2, which produce IL-4, IL-13 and IL-5 [9]. The resolution and resistance to infection is  
87 related, as mentioned above, to the production of Th1 cytokines, and the susceptibility  
88 to the production of Th2 cytokines.

89

90 Communication between cells occurs by different mechanisms. It can be, for instance,  
91 through growth factors, cytokines, nucleotides, lipids, nitric oxide, peptides, and

92 adhesion molecules. An additional mechanism is by the release of extracellular vesicles  
93 (EVs). The production of EVs by dendritic cells, mast cells, macrophages, and B and T  
94 lymphocytes has been extensively described in the literature [10]. These EVs carry the  
95 phenotypic characteristics of the cells they originate from. Thus, depending on their  
96 origin, they may express MHC class II molecules and may transport antigens [11,12].

97

98 Macrophages infected by microorganisms produce EVs, which can induce  
99 proinflammatory responses *in vitro* and *in vivo* [13–16]. Because of their immune  
100 modulatory capabilities, EVs are being investigated as components of future vaccines  
101 [17–20]. Three main types of EVs have been described in the literature: exosomes,  
102 microparticles and apoptotic bodies [11].

103

104 Exosomes are small vesicles of endosomal origin that are released by various cell types,  
105 including macrophages, and that are capable of modulating the immune response [21].  
106 They range in size from 40 to 100 nm and have rounded and flattened morphology [22].  
107 When derived from antigen-presenting cells, they can promote the adaptive immune  
108 response by presenting MHC class II molecules-peptide complexes to naïve CD4<sup>+</sup> T  
109 cells as well as inducing specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses [23–26].

110

111 It has been demonstrated that exosomes carry antigens from cells infected with  
112 intracellular microorganisms such as mycobacteria [27], cytomegalovirus [28], and  
113 *Leishmania* [29], as well as from tumor cells [30].

114

115 Microparticles are cellular fragments with diameters ranging from 100 to a 1000 nm.  
116 They contain cytoplasmic components, such as proteins and nucleic acids, and are  
117 released by the budding off of cell plasma membranes after cell activation and  
118 apoptosis [31].

119  
120 The microparticles can be characterized by the presence of surface molecules from the  
121 cells which they were derived from [11,32]. Microparticles from macrophages infected  
122 with *Mycobacterium tuberculosis* carry antigens and promote inflammation by activating  
123 CD4<sup>+</sup> T cells [33]. Those from macrophages infected with *Listeria monocytogenes* also  
124 carry antigens and elicit a protective immune response [34]. Some studies suggest that  
125 macrophages are activated by microparticles via the toll-like receptor 4 (TLR4) [35].

126  
127 Unlike other EVs, which are released by cell activation and in the early stages of  
128 apoptosis, apoptotic bodies are formed in the final stages of the apoptotic process. They  
129 have larger diameter (1-5 µm) than the other EVs and display phosphatidylserine  
130 molecules in their membranes [36]. They have also been shown to induce immune  
131 responses [37].

132  
133 In the present work, EVs obtained from BALB/c mouse *Leishmania amazonensis*-  
134 infected macrophages were compared with EVs from uninfected macrophages in terms  
135 of eliciting the production of cytokines by naïve macrophages. The BALB/c mouse - *L.*  
136 *amazonensis* combination was chosen due to the fact that that *Leishmania* species

137 causes a progressive cutaneous disease in that strain of mice, and we hypothesized  
138 that macrophage-derived EVs could promote the infection.

139

140 It was found, on the contrary, that EVs from *L. amazonensis*-infected macrophages  
141 promote the release by other macrophages of cytokines which could induce an  
142 inflammatory response.

143

## 144 **METHODS**

### 145 **Ethics Statement, Animals and Parasites**

146 BALB/c mice aged 4-8 weeks were used for collecting resident macrophages and bone  
147 marrow cells. The animals received balanced feed and water *ad libitum*. All procedures  
148 were performed in accordance with the recommendations of the Commission on the  
149 Use of Experimental Animals of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador,  
150 Brazil. *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA/125) parasites were maintained by regular  
151 passages in Golden hamsters. The promastigotes derived from tissue amastigotes were  
152 grown under sterile conditions at 24° C in Schneider's medium (Schneider's drosophila  
153 medium, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing 50 µg.mL<sup>-1</sup>  
154 gentamicin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island,  
155 NY).

156

### 157 **Infection of Macrophages and Isolation of Membrane Vesicles**

158 Bone marrow-derived macrophages were differentiated into macrophages by 7-8 days  
159 incubation with RPMI (supplemented with 10% FBS, 50 µg/mL of gentamicin, 3.6 g/L of

160 sodium bicarbonate, 25 mM HEPES and 2 mM glutamine) containing 30% supernatant  
161 of culture of transfected cells that express GM-CSF. Macrophages were incubated with  
162 stationary-phase *L. amazonensis* promastigotes at parasite to macrophage ratio 50:1  
163 during 6 hours, followed by a washing to remove non-internalized parasites. To isolate  
164 the EVs, the infected and control non-infected macrophages were cultured for 9 days.  
165 The culture supernatants were centrifuged at 500 g for 10 minutes at 4° C, 1500 g for  
166 10 minutes at 4° C, and 8,000 g for 5 minutes at 4° C to remove residual cells and  
167 cellular debris. The EVs present in the supernatants were washed once with Hanks'  
168 balanced salt solution (HBSS) by centrifugation at 100,000 g for 45 minutes at 4° C and  
169 resuspended in HBSS. Cells were also cultured over glass coverslips and stained with  
170 hematoxylin and eosin (H&E) for determining the infection rate.

171

## 172 **Flow Cytometry**

173 For characterization of the EVs, the macrophages were incubated with PKH26 or  
174 carboxyfluorescein diacetate (CFDA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the culture  
175 supernatant was centrifuged for isolation of the EVs, which were analyzed in a flow  
176 cytometer together with 1 µm-diameter fluorescent beads (Invitrogen, CA, USA).  
177 Monoclonal antibody (mAb)-fluorochrome or biotin conjugates (phycoerythrin - anti-  
178 CD11b mAb, phycoerythrin-cyanine - anti-F4/80 mAb, biotin-anti-I-A<sup>d</sup> mAb) were from  
179 eBioscience (San Diego, CA, USA). Annexin V-FITC and propidium iodide were from  
180 Sigma (Apoptosis Detection Kit - St. Louis, MO, USA). The cells were washed with  
181 FACS buffer (0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2—PBS—with 5% FBS). The  
182 cells or EVs were incubated with the conjugates on ice for 20 min and washed twice.

183 Those incubated with biotin-mAb conjugates were subsequently incubated with  
184 phycoerythrin-avidin for 20 minutes. The cell or EVs suspensions were then washed  
185 once with PBS (0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2) and analyzed in a flow  
186 cytometer.

187

188 The enumeration of EVs was done by flow cytometry, based on the number of events  
189 occurring in a gate for particles of the right size in a determined time, in four  
190 extravascular vesicle preparations from *L. amazonensis*-infected macrophages and four  
191 preparations from non-infected macrophages.

192

### 193 **Macrophage Treatment with Membrane Vesicles**

194 Peritoneal macrophages without stimulation with thioglycollate were obtained by  
195 washing the peritoneal cavity with 0.9% NaCl containing 20 UI/mL heparin. One million  
196 peritoneal macrophages were distributed in each well of 24-well plates. The  
197 macrophages were incubated for 48 hours with EVs from uninfected macrophages  
198 (EVmedium) and EVs from *L. amazonensis*-infected macrophages (EVL<sub>a</sub>) in the  
199 absence or presence of 1 ng/mL bacterial lipopolysaccharide (LPS; Escherichia coli  
200 0127:B8, Sigma-Aldridge, St. Louis, MO, USA) at 37° C and 5 % CO<sub>2</sub>. In cultures that  
201 received EVmedium and EVL<sub>a</sub> in the absence of LPS, 10 µg/mL of polymyxin B (Sigma-  
202 Aldridge, St. Louis, CA, USA) were added to rule out the possibility that a putative LPS  
203 contamination could compromise the interpretation of results. The concentrations of  
204 EVs used in the treatment were the same concentrations they were in the macrophage  
205 culture supernatants from which they were isolated.

206

### 207 **Macrophage Viability Analysis**

208 RPMI containing Alamar blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 10% was added to  
209 cultures of bone marrow-derived macrophages at the 1st, 3rd, 6th, 9th and 12th days  
210 after infection with *L. amazonensis*, or to cultures of control uninfected macrophages, in  
211 24-well plates. After incubation for 4 hours at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>, the absorbance at  
212 wavelengths of 570 and 600 nm was read in 96-well microplates. As assay controls,  
213 wells received only culture medium and medium with Alamar blue.

214

### 215 **Cytokine Detection**

216 The concentrations of cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-1 $\beta$  and IL-10) in  
217 supernatants were determined with the Ready-Set-Go <sup>®</sup> kit (eBiosciences, San Diego,  
218 CA, USA).

219

### 220 **Electron Microscopy**

221 EVs were fixed with sodium cacodylate buffer and 2% paraformaldehyde for 2 hours at  
222 room temperature. After fixation, the EVs were centrifuged at 100,000 g for 45 minutes,  
223 resuspended in 150 mM saline phosphate buffer, pH 7.2, and passed through filters  
224 with pore size of 0.22  $\mu$ m in diameter. The EVs were adsorbed to copper (Formvar)  
225 grids for 20 minutes. Phosphotungstic acid was used at 2% for negative staining. The  
226 EVs were visualized in a transmission electron microscope (Zeiss EM 109; Munich,  
227 Germany). The macrophages were fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2%  
228 paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Post-fixation was performed with

229 1 % osmium tetroxide, 0.8 % potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1  
230 M sodium cacodylate buffer. Dehydration was performed with acetone and the material  
231 mounted in resin (Polybed 812). The resin block was cut in an ultramicrotome,  
232 contrasted, and the material observed in a transmission electron microscope.

233

### 234 **Statistical Analyses**

235 To compare the levels of a given cytokine in cultures treated either with EVLa or  
236 EVmedium, the following assumptions were made:

237

238 - the distribution of the data was nongaussian [this assumption was made because the  
239 number of different EVLa and EVmedium preparations tested ( $n = 6$ ) was too small to  
240 allow the determination of the type of distribution];

241

242 - the EVLa would stimulate the production of either proinflammatory cytokines or  
243 regulatory cytokines, or of both, more than the EVmedium, and the EVs would stimulate  
244 the production of one or more of these cytokines so that their concentrations in the  
245 culture supernatants would be higher than in the supernatants of unstimulated  
246 macrophage cultures.

247

248 These two assumptions determined that a directional non-parametric method should be  
249 applied. The Wilcoxon's signed-rank test was therefore used to determine the statistical  
250 significance of differences in cytokine levels in six independent experiments, and the  
251 Mann-Whitney's U test was used to determine the statistical significance of differences

252 in macrophage viability and extracellular vesicle numbers. The differences were  
253 considered significant when  $P$  was  $\leq 0.05$ .

254

## 255 **RESULTS AND DISCUSSION**

### 256 **Characterization of macrophages of myeloid origin and of their infection by *L.*** 257 ***amazonensis***

258 The cells differentiated from bone marrow cells were stained with surface antibodies  
259 specific for murine monocytes (anti-CD11b and anti-F4/80) for the purpose of evaluating  
260 their phenotype by flow cytometry. A percentage of 88 % of cells double-labeled for anti-  
261 F4/80 and anti-CD11b was observed (Fig. 1A), indicating that at least the vast majority  
262 of them were macrophages.

263

264 The infection of macrophages by *Leishmania* was evaluated by optical microscopy of  
265 H&E stained slides. The number of intracellular parasites increased with time. After nine  
266 days of culture, at the moment that the EVs were collected, about 100 % of the cells  
267 were infected (Fig. 2A), with an average of 16 parasites per macrophage (not shown).

268

### 269 **Characterization of EVs**

270 The presence of EVs was demonstrated, by flow cytometry, in the supernatant of  
271 macrophages that had been labeled with PKH26 (Fig. 1B). PKH26 incorporation  
272 confirmed the presence of lipid membranes associated with the EVs. The integrity of the  
273 EVs was demonstrated by flow cytometry with CFDA, a substance that permeates intact  
274 cell membranes and enters the cytosol, where it is converted by esterases into a green

275 fluorescent derivative [38] (not shown). The EVs, as expected, had diameters smaller  
276 than 1  $\mu\text{m}$ , as demonstrated by flow cytometry in the presence of 1  $\mu\text{m}$ -diameter beads  
277 (Fig. 1C).

278

279 The EVs derived from these macrophages, infected or not with *L. amazonensis* and  
280 incubated for a period of 9 days, were stained with antibodies specific for murine  
281 monocytes (anti-CD11b and anti-F4/80) as well as for the antigen-presenting molecule  
282 MHC II. EVs have different membrane compositions, depending on the cell from which  
283 they have originated (reviewed in [11]). The fact that the VM present in the supernatants  
284 of macrophages in this work presented with the surface markers CD11b and F4/80, as  
285 well as MHC class II (Fig. 1D, E, F), indicates their macrophage origin.

286

287 About 23 % of infected macrophages stained with Annexin V. A smaller proportion (14  
288 %) of uninfected macrophages were stained with that reagent (Fig. 1G, H). This fact  
289 suggests that many EVs had apoptotic origin, as Annexin V binds to phosphatidyl serine  
290 molecules that are exposed in cell membranes during the apoptotic process [39]. In  
291 accordance with this possibility, there was a more prominent reduction of macrophage  
292 numbers in infected cultures than in uninfected cultures (Fig. 2B).

293

294 Transmission electron microscopy by negative contrast allowed the visualization of EVs  
295 and the observation of their heterogeneity in size. This visualization method has been  
296 described as appropriate for showing the presence of EVs [13]. The visualized EVs had  
297 spherical shapes and diameters ranging from 50 to 300 nm (Fig. 3A).

298

299 The macrophages infected with *L. amazonensis* were also evaluated by transmission  
300 electron microscopy, through which it was possible to visualize the formation of  
301 microparticles by blistering of the infected cell after nine days of culture (Fig. 3B). A  
302 similar formation of EVs in dendritic cells treated with LPS after 6 hours of cultivation  
303 was described by Obregon and collaborators [40].

304

305 The content of the vesicles had similar density to the cytosol and they were surrounded  
306 by cytoplasmic membrane (Fig. 3B).

307

308 As described above, the presence of *bona fide* EVs in the 100,000 g pellet of  
309 macrophage supernatants used in the present work was confirmed by several  
310 parameters. Judging by their size, the EVs could consist exclusively of microparticles or  
311 of microparticles and exosomes. Apoptotic bodies could be ruled out, despite the  
312 staining of the EVs with Annexin V, because they had diameters larger than 1  $\mu\text{m}$ . As  
313 was mentioned in the introduction, microparticles are also released by apoptotic cells.

314

315 ***Leishmania*-infected macrophages release more EVs than non-infected**  
316 **macrophages**

317 The number of EVs in the supernatant of infected macrophages, as detected by flow  
318 cytometry, was significantly larger than in non-infected macrophages (mean ratio of  
319 EV<sub>La</sub>/EV<sub>medium</sub> = 1.5, range 1.1 to 2.1;  $p < 0.025$ , Mann-Whitney U test).

320

321 **EVs derived from *L. amazonensis*-infected macrophages induce the production of**  
322 **proinflammatory cytokines by naïve macrophages**

323 The ability of EVs derived from macrophages, infected (EVL<sub>a</sub>) or not (EV<sub>medium</sub>) with *L.*  
324 *amazonensis* (with a parasite: macrophage ratio of 50:1) for 9 days, to stimulate  
325 cytokine production by resident peritoneal macrophages (without stimulation with  
326 thioglycolate) was evaluated. The peritoneal macrophages were incubated with the  
327 EVs in the presence or absence of LPS for 48 hours. Cultures to which LPS was not  
328 added also contained polymyxin B, to rule out the effect of endotoxin that could be  
329 contaminating the preparations. Similar results were observed in experiments with and  
330 without polymyxin B (data not shown), indicating that putatively contaminating endotoxin  
331 did not participate in the obtained results.

332

333 A certain degree of variation in the pattern of secreted cytokines was observed in the six  
334 independent experiments that were carried out, both with the preparations of EV<sub>medium</sub>  
335 and EVL<sub>a</sub>. This fact, which could depend on the batch of the EVs, on the  
336 responsiveness of the naïve macrophages, or on both, could have hindered the  
337 obtaining of statistically significant results for some cytokines. A great variation in the  
338 response of individual macrophage preparations to LPS was observed (data not shown),  
339 showing that the responsiveness of the naïve macrophage preparation was, at least in  
340 part, responsible by the observed variations in the response to EVs. This variation did  
341 not, however, affect the acquisition of consistent results for IL-12p70, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$   
342 when the EVL<sub>a</sub> were tested (Fig. 4).

343

344 In all six experiments, the addition of EVLa to both unstimulated and LPS-stimulated  
345 cultures led to higher levels of IL-12p70 and IL-1 $\beta$  than the addition of EVmedium (Figs.  
346 4A, 4B, 4C, and 4D;  $p < 0.025$ , Wilcoxon's signed-rank sum test). Although there was a  
347 statistically significant difference between macrophages that were not stimulated with  
348 LPS when they were treated with EVLa or EVmedium in terms of IL-1 $\beta$  production, in 3  
349 out of 6 experiments the difference was minimal (Fig. 4C).

350

351 Despite the presence of smaller amounts of IL-12p70 and IL-1 $\beta$  when EVmedium were  
352 added to the cultures than when EVLa were added, 2 out of 6 and 3 out of 6  
353 EVmedium preparations increased the IL-12p70 levels above those observed in non-  
354 stimulated and LPS-stimulated macrophage cultures, respectively, incubated without  
355 any EV (Figs. 4A and 4B). These increases were not statistically significant ( $p > 0.05$ ,  
356 Wilcoxon's signed-rank sum test). On the other hand, increased levels were observed in  
357 cultures of EVLa-treated, unstimulated or LPS-stimulated macrophages in all six  
358 experiments (Figs. 4A and 4B). These increases were statistically significant ( $p < 0,025$ ,  
359 Wilcoxon's signed-rank sum test).

360

361 In all six experiments, the addition of both EVmedium and of EVLa to cultures without  
362 LPS led to increased production of IL-1 $\beta$  (Fig. 4C;  $p < 0.025$ , Wilcoxon's signed-rank  
363 sum test). On the other hand, the addition of EVmedium to LPS-stimulated cultures  
364 increased the production of IL-1 $\beta$  in only three out of six experiments (Fig. 4D,  $p > 0.05$ ,  
365 Wilcoxon's signed-rank test), whereas the addition of EVLa increased the production of  
366 IL-1 $\beta$  in all six experiments (Fig. 4D;  $p < 0.025$ , Wilcoxon's signed-rank sum test).

367

368 Levels of TNF- $\alpha$  were higher in cultures of EVmedium-treated unstimulated and LPS-  
369 stimulated macrophages than in cultures to which no EVs were added in 4 out of 6 and  
370 in 3 out of 6 experiments, respectively (Figs. 4E and 4F). These increases were not  
371 statistically significant ( $p > 0.05$ , Wilcoxon's signed-rank sum test). TNF- $\alpha$  levels were  
372 increased in cultures of EVLa-treated macrophages, treated or non-treated with LPS, in  
373 all six experiments (Figs. 4E and 4F;  $p < 0.05$ , Wilcoxon's signed-rank sum test). Clearly  
374 higher levels of TNF- $\alpha$  in cultures of EVLa-treated macrophages than in cultures of  
375 EVmedium-treated macrophages were observed in only two experiments in the  
376 absence of LPS and in 5 out 6 experiments in the presence of LPS (Figs. 4E and 4F;  $p$   
377  $< 0.05$ , Wilcoxon's signed-rank test).

378

379 One of the mechanisms of resistance of *L. amazonensis* to the immune system is an  
380 inhibition of IL-12 production by infected macrophages [41]. The effect of EVLa seen in  
381 this work suggests that a mechanism, namely the release of VMs might, at least in part,  
382 counteract this effect by inducing the production of IL-12, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by bystander  
383 macrophages before they are infected.

384

385 Thus, the contact of EVs from infected macrophages with non-infected macrophages,  
386 perhaps entailing the incorporation of these EVs, together with the possible carrying  
387 over of *Leishmania* antigens by the EVs to the naïve macrophages, could promote  
388 differentiation of Th0 to Th1 lymphocytes, which would release IFN- $\gamma$ , resulting in a Th1  
389 response that is associated with resistance to the *Leishmania* infection [5,42]. In

390 addition, an increased production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  which would also be induced in  
391 naïve macrophages by the EVs, is associated with host's resistance to *Leishmania*  
392 infection through the production of nitric oxide [43,44]. Consistent with this, it has been  
393 reported that the injection of anti-TNF- $\alpha$  into mice worsened the *Leishmania* infection  
394 [45]. The phenomena described above could perhaps underlie the protective response  
395 that normally keeps the *Leishmania* parasites in check in most infected human beings  
396 [46,47].

397

398 No statistically significant differences in the levels of IL-6 and IL-10 in cultures to which  
399 EVmedium or EVLa were added were seen (Figs. 4G, 4H, 4I and 4J). Despite that, it  
400 can be noted that in 3 out of 6 cultures containing LPS, the concentrations of IL-10, an  
401 immune regulatory cytokine [48,49], were lower with the addition of EVLa than when  
402 EVmedium was added (Fig. 4J). In the case of IL-6, a proinflammatory cytokine [50],  
403 the contrary was seen: in 3 out of 6 cultures containing LPS, the concentrations of that  
404 cytokine were markedly higher with the addition of EVLa than when EVmedium was  
405 added (Fig. 4H).

406

407 EVLa, therefore, are proinflammatory to macrophages. Macrophages infected with  
408 *Mycobacterium bovis* (BCG) release exosomes with capacity to generate  
409 proinflammatory immune responses *in vitro* and *in vivo* and that contain mycobacterial  
410 proteins [13,27]. It seems, therefore, that the proinflammatory nature could be a general  
411 feature of EVs originated from infected cells.

412

413 One possibility that was not ruled out in the present work is that the biological activity of  
414 the EVLa would be mediated by *Leishmania*-derived EVs, which has been described in  
415 the literature [29,51]. However, contrary to the present observations, these *Leishmania*  
416 EVs had a suppressive effect on antigen-presenting cells [29,51].

417

418 Since *Leishmania* parasites readily sediment at 1.500 g (unpublished observation), the  
419 centrifugation of the EVLa-containing supernatants at 8.000 g during the process of  
420 EVLa preparation eliminated the contamination of the EVLa preparations with  
421 *Leishmania*.

422

423 Some of the experiments described here were carried out in the presence of bacterial  
424 LPS, which activates macrophages by leading to signal transduction by TLR4. This  
425 experimental procedure was done in order to better emulate the *in vivo* situation, in  
426 which neutrophil elastase may stimulate macrophages via TLR4 [52].

427

428 The naïve macrophage arming process described herein could perhaps be more  
429 intense during a *Leishmania* infection, in which EVLa would be released, but it seemed  
430 also to occur, in a smaller extent, with EVs from uninfected macrophages in the  
431 absence of LPS, at least as far as IL-1 $\beta$  is concerned (Fig. 4C). Whether this apparently  
432 spontaneous release of EVs that stimulate the production of IL-1 $\beta$  is an *in vitro* artefact  
433 or a relevant phenomenon *in vivo* open to speculation. EVs are certainly released in  
434 physiological contexts, as can be exemplified by the finding of circulating EVs in healthy  
435 human beings' plasma samples [53].

436

437 In the present work, in order to better identify differences in EVs from infected and non-  
438 infected macrophages, the concentrations in which their effect in naïve macrophages  
439 was assessed were the same one that were present in the supernatants from the  
440 macrophages that released them. As the non-infected macrophages released a smaller  
441 number of EVs than the infected macrophages, less EVmedium was added to the  
442 macrophages than EVLa. The experiments described in this work, therefore, although  
443 being more faithful to what may occur *in vivo* (where quantitative differences do matter)  
444 do not allow us to discriminate between qualitative or quantitative differences between  
445 EVLa and EVmedium.

446

447 One of the possible mechanisms that could account for the observed effect of the EVs  
448 would be their ligation to receptor of danger-associated molecular patterns (DAMPs) on  
449 the macrophage surface. EVs could present DAMPs from apoptotic or necrotic cells,  
450 such as lectin C, which is expressed in dead cells or in cell in death process [54]. As  
451 presented above, there is indirect evidence that apoptosis might be involved in the  
452 generation of at least part of the EVLa. Other components, such as uric acid,  
453 cholesterol crystals and oxygen reactive species are recognized by NLRP3 receptors  
454 [55], activating the NLRP3 inflammasome and leading to the production of  
455 proinflammatory cytokines. The activation of that inflammasome has been shown to  
456 lead to the production of IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  [56].

457

458 One possible exploitation of proinflammatory EVs (piEV) is to use them in vaccination  
459 and immunotherapeutic procedures, since they may carry MHC-antigenic peptide  
460 complexes, unbound antigens [11], cytokines that intensify the immune response and/or  
461 direct them to a given type (e. g. Th1) and costimulatory molecules. As mentioned  
462 above, exosomes from BCG-infected macrophages generate proinflammatory immune  
463 responses *in vivo* and contain mycobacterium protein [13,27]. In addition, exosomes  
464 from dendritic cells pulsed with *Leishmania* antigen confer protection against infection  
465 with *L. major* in mice [20]. The fact that the antigens would be inside lipid membrane-  
466 surrounded particles could provide an advantage in terms of immunization: *Leishmania*  
467 antigens have greater protective effect when they are encapsulated in liposomes than  
468 when they are administered alone [57,58].

469

470 The piEV could perhaps both prime T cells through antigen-presentation by MHC-  
471 peptide complexes and costimulatory molecules and directly stimulate antigen-  
472 presenting cells (APCs), as shown in the present work, to release IL-12, which would  
473 favour the development of a protective Th1 immune response against intracellular  
474 pathogens. Neoplastic cell antigen-pulsed dendritic cells have been successfully used in  
475 cancer immunotherapy [59]. It requires investigation to see whether piEV would also  
476 serve the same purpose, and whether there would be any advantage in their use over  
477 the use of dendritic cells. The caveats described below, however, should be taken into  
478 account.

479

480 (i) In order to stimulate T cells, the piEV would have to share at least one MHC  
481 haplotype with the recipient. This would not be necessary if the desired effect would be  
482 just to carry over antigen to APCs and to stimulate them to release cytokines such as  
483 IL-12.

484

485 (ii) Any MHC mismatch would entail the triggering of a strong alloreactive immune  
486 reaction after the first injection. Allogeneic immune reactions are even stronger than  
487 heterologous reactions, due to the high extent of alloreactivity in the T-cell population  
488 [60], and could therefore interfere with the desired immune response. One possibility for  
489 producing batches of EVs that could be used in different individuals would be to obtain  
490 EVs from cells of a mammal of another species, avoiding, therefore, the strong  
491 alloreactive responses. It seems that indeed it is not necessary to have MHC  
492 compatibility to obtain an EV-mediated immunological effect on cells: exosomes derived  
493 from dendritic cells pulsed with *Toxoplasma gondii* antigens induce a protective  
494 response in allogeneic mice [17]. It may be worthwhile to investigate whether the  
495 immune response against heterologous antigens, present in EVs, would have a  
496 stimulatory or inhibitory effect on the desired anti-pathogen immune response.

497

498 (iii) The degree of stability of the piEV at different temperatures would have to be  
499 determined. It has been shown that EV are preserved after being frozen and thawed  
500 without a requirement for cryopreservatives [61].

501

502 (iv) The cost of production of a piEV-based vaccine could be high, since it entails large-  
503 scale cell cultivation.

504

505 The capacity of infected macrophage-derived piEC in conferring a resistant phenotype  
506 to *Leishmania* infection *in vitro* and *in vivo*, and the possible presence of *Leishmania*  
507 antigens in them, are currently under investigation.

508

## 509 **CONCLUSIONS**

510 As shown in the present work, EVs from macrophages infected with *L. amazonensis*  
511 induce the production of proinflammatory cytokines by naïve macrophages, and may,  
512 therefore, play a role in stimulating the immune response and in conferring a resistant  
513 phenotype to naïve, bystander macrophages.

514

515

## 516 **COMPETING INTERESTS**

517 The authors declare that they have no competing interests.

518

## 519 **AUTHOR'S CONTRIBUTIONS**

520 AC-A contributed to acquisition, analysis of data, and drafting of the manuscript; LA-F  
521 contributed to the acquisition and analysis of data; CFdA and VJR contributed to  
522 acquisition of data; CF developed and carried out the negative stained electronic  
523 microscopy technique and contributed to the analysis of data; LARF contributed to the  
524 analysis of data; PRO and PV contributed to the design of experiments; LCP-d-C

525 conceived and designed the experiments, analysed and interpreted the data, and wrote  
526 the final version of the manuscript. All authors read and approved the final version of the  
527 manuscript.

528

## 529 **ACKNOWLEDGEMENTS**

530 We acknowledge financial support from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado  
531 da Bahia—FAPESB and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
532 Tecnológico—CNPq. The funders had no role in study design, data collection and  
533 analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We are grateful to Dr.  
534 Washington L. Conrado dos-Santos for reviewing this work manuscript.

535

536

537

## 538 **REFERENCES**

- 539 1. Desjeux P (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans*  
540 *R Soc Trop Med Hyg* 95: 239–243.
- 541 2. Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp*  
542 *Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305–318. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.004.
- 543 3. Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191–1199. doi:10.1016/S0140-  
544 6736(98)10178-2.

- 545 4. Alexander J, Satoskar a R, Russell DG (1999) Leishmania species: models of  
546 intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18: 2993–3002.
- 547 5. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, et al. (1993)  
548 Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T  
549 helper type 1 immune response. *J Exp Med* 177: 1797–1802.
- 550 6. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK (1993)  
551 Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp*  
552 *Med* 177: 1505–1509.
- 553 7. Trinchieri G (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with  
554 immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific  
555 adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251–276.  
556 doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.001343.
- 557 8. Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, et al. (1996) *Leishmania*  
558 promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived  
559 macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183: 515–526.
- 560 9. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo  
561 imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by  
562 sand flies. *Science* 321: 970–974. doi:10.1126/science.1159194.
- 563 10. O'Neill HC, Quah BJC (2008) Exosomes secreted by bacterially infected  
564 macrophages are proinflammatory. *Sci Signal* 1: pe8. doi:10.1126/stke.16pe8.

- 565 11. Théry C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of  
566 immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 581–593. doi:10.1038/nri2567.
- 567 12. Johansson SM, Admyre C, Scheynius A, Gabrielsson S (2008) Different types of  
568 in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with  
569 distinct phenotypes. *Immunology* 123: 491–499. doi:10.1111/j.1365-  
570 2567.2007.02714.x.
- 571 13. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS (2007) Exosomes released  
572 from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a  
573 proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110: 3234–3244.  
574 doi:10.1182/blood-2007-03-079152.
- 575 14. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS (2007) Exosomes released  
576 from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a  
577 proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110: 3234–3244.  
578 doi:10.1182/blood-2007-03-079152.
- 579 15. Schorey JS, Bhatnagar S (2008) Exosome function: from tumor immunology to  
580 pathogen biology. *Traffic* 9: 871–881. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.
- 581 16. Giri PK, Kruh N a, Dobos KM, Schorey JS (2010) Proteomic analysis identifies  
582 highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture  
583 filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics* 10: 3190–3202.  
584 doi:10.1002/pmic.200900840.

- 585 17. Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I (2007) A vaccine based  
586 on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii*  
587 infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect* 9: 1614–1622.  
588 doi:10.1016/j.micinf.2007.07.002.
- 589 18. Chaput N, Scharz NEC, André F, Taïeb J, Novault S, et al. (2004) Exosomes as  
590 potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently  
591 prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol* 172: 2137–  
592 2146.
- 593 19. Del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, et al. (2011) Induction of  
594 protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded  
595 dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine* 29: 3818–3825.  
596 doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.022.
- 597 20. Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer K a, Moll H (2010) Fragments of  
598 antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective  
599 immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* 28: 5785–5793.  
600 doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.077.
- 601 21. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, et al. (2001)  
602 Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular  
603 compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309–7318.
- 604 22. Meckes DG, Raab-Traub N (2011) Microvesicles and viral infection. *J Virol* 85:  
605 12844–12854. doi:10.1128/JVI.05853-11.

- 606 23. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding C V, et al. (1996)  
607 B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161–1172.
- 608 24. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, et al. (1998) Eradication of  
609 established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived  
610 exosomes. *Nat Med* 4: 594–600. doi:10.1038.
- 611 25. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and  
612 function. *Nat Rev Immunol* 2: 569–579. doi:10.1038/nri855.
- 613 26. Admyre C, Johansson SM, Paulie S, Gabrielsson S (2006) Direct exosome  
614 stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* 36:  
615 1772–1781. doi:10.1002/eji.200535615.
- 616 27. Bhatnagar S, Schorey JS (2007) Exosomes released from infected macrophages  
617 contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol*  
618 *Chem* 282: 25779–25789. doi:10.1074/jbc.M702277200.
- 619 28. Walker JD, Maier CL, Pober JS (2009) Cytomegalovirus-infected human  
620 endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing  
621 antigenic exosomes. *J Immunol* 182: 1548–1559.
- 622 29. Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, et al. (2010)  
623 *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through  
624 effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 185: 5011–5022.  
625 doi:10.4049/jimmunol.1000541.

- 626 30. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, et al. (2001) Tumor-derived  
627 exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming.  
628 Nat Med 7: 297–303. doi:10.1038/85438.
- 629 31. Zwaal RF, Schroit a J (1997) Pathophysiologic implications of membrane  
630 phospholipid asymmetry in blood cells. Blood 89: 1121–1132.
- 631 32. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no  
632 more. Trends Cell Biol 19: 43–51. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003.
- 633 33. Walters SB, Kieckbusch J, Nagalingam G, Swain A, Latham SL, et al. (2013)  
634 Microparticles from mycobacteria-infected macrophages promote inflammation  
635 and cellular migration. J Immunol 190: 669–677. doi:10.4049/jimmunol.1201856.
- 636 34. Zhang Y, Zhang R, Zhang H, Liu J, Yang Z, et al. (2012) Microparticles released  
637 by *Listeria monocytogenes*-infected macrophages are required for dendritic cell-  
638 elicited protective immunity. Cell Mol Immunol 9: 489–496.  
639 doi:10.1038/cmi.2012.33.
- 640 35. Thomas LM, Salter RD (2010) Activation of macrophages by P2X7-induced  
641 microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially  
642 dependent on TLR4. J Immunol 185: 3740–3749. doi:10.4049/jimmunol.1001231.
- 643 36. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of  
644 rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol 6: 21–29.  
645 doi:10.1038/nrrheum.2009.229.

- 646 37. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002) A blast from the past: clearance  
647 of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2: 965–975.  
648 doi:10.1038/nri957.
- 649 38. Meimaridou E, Jacobson J, Seddon AM, Noronha-Dutra AA, Robertson WG, et al.  
650 (2005) Crystal and microparticle effects on MDCK cell superoxide production:  
651 oxalate-specific mitochondrial membrane potential changes. *Free Radic Biol Med*  
652 38: 1553–1564. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.020.
- 653 39. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, et al.  
654 (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression  
655 on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415–1420.
- 656 40. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP (2006)  
657 Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells,  
658 allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol* 169: 2127–2136.  
659 doi:10.2353/ajpath.2006.060453.
- 660 41. Ruhland A, Kima PE (2009) Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant  
661 negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania*  
662 *amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol* 122: 28–36.  
663 doi:10.1016/j.exppara.2008.12.010.
- 664 42. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK (1993)  
665 Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp*  
666 *Med* 177: 1505–1509.

- 667 43. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, et al. (2013)  
668 Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance  
669 to Leishmania. *Nat Med* 19: 909–915. doi:10.1038/nm.3221.
- 670 44. Liew FY, Li Y, Millott S (1990) Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in  
671 leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is  
672 mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 71: 556–559.
- 673 45. Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M (1990) Tumour necrosis  
674 factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against  
675 cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 69: 570–573.
- 676 46. Souza MA, Castro MCAB, Oliveira AP, Almeida AF, Reis LC, et al. (2012)  
677 American tegumentary leishmaniasis: cytokines and nitric oxide in active disease  
678 and after clinical cure, with or without chemotherapy. *Scand J Immunol* 76: 175–  
679 180. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02717.x.
- 680 47. De Assis Souza M, de Castro MCAB, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida  
681 TM, et al. (2013) Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis  
682 patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals.  
683 *Microb Pathog* 57: 27–32. doi:10.1016/j.micpath.2013.02.004.
- 684 48. Bacellar O., M. CE (2005) Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gaz*  
685 *Médica da Bahia* 75: 24–34.

- 686 49. Carvalho a K, Silveira FT, Passero LFD, Gomes CMC, Corbett CEP, et al. (2012)  
687 Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential  
688 expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model.  
689 Parasite Immunol 34: 395–403. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01370.x.
- 690 50. Hatzigeorgiou DE, He S, Sobel J, Grabstein KH, Hafner A, et al. (1993) IL-6  
691 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human  
692 macrophages. J Immunol 151: 3682–3692.
- 693 51. Silverman JM, Reiner NE (2011) Leishmania exosomes deliver preemptive strikes  
694 to create an environment permissive for early infection. Front Cell Infect Microbiol  
695 1: 26. doi:10.3389/fcimb.2011.00026.
- 696 52. Faria MS, Reis FCG, Azevedo-Pereira RL, Morrison LS, Mottram JC, et al. (2011)  
697 Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil  
698 elastase promoting parasite survival in murine macrophages. J Immunol 186:  
699 411–422. doi:10.4049/jimmunol.1002175.
- 700 53. Pankoui Mfonkeu JB, Gouado I, Fotso Kuate H, Zambou O, Amvam Zollo PH, et  
701 al. (2010) Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral  
702 dysfunctions in human severe malaria. PLoS One 5: e13415.  
703 doi:10.1371/journal.pone.0013415.
- 704 54. Sancho D, Reis e Sousa C (2013) Sensing of cell death by myeloid C-type lectin  
705 receptors. Curr Opin Immunol 25: 46–52. doi:10.1016/j.coi.2012.12.007.

- 706 55. Dubaniewicz A (2013) Microbial and human heat shock proteins as “danger  
707 signals” in sarcoidosis. *Hum Immunol*. doi:10.1016/j.humimm.2013.08.275.
- 708 56. Edye ME, Lopez-Castejon G, Allan SM, Brough D (2013) Acidosis Drives  
709 Damage-associated Molecular Pattern (DAMP)-induced Interleukin-1 Secretion  
710 via a Caspase-1-independent Pathway. *J Biol Chem* 288: 30485–30494.  
711 doi:10.1074/jbc.M113.478941.
- 712 57. Bhowmick S, Ravindran R, Ali N (2007) Leishmanial antigens in liposomes  
713 promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral  
714 leishmaniasis via polarized Th1 response. *Vaccine* 25: 6544–6556.  
715 doi:10.1016/j.vaccine.2007.05.042.
- 716 58. Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, et al. (2009) The  
717 role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice  
718 immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63).  
719 *Exp Parasitol* 121: 362–369. doi:10.1016/j.exppara.2008.12.015.
- 720 59. Banchereau J, Palucka AK (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against  
721 cancer. *Nat Rev Immunol* 5: 296–306. doi:10.1038/nri1592.
- 722 60. Benichou G, Kant CD, Madsen J, Tocco G (2007) Modulation of alloreactivity to  
723 MHC-derived peptides and transplantation tolerance. *Front Biosci* 12: 4239–4247.

724 61. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG (2012) Methodology for isolation,  
725 identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. J Immunol  
726 Methods 375: 207–214. doi:10.1016/j.jim.2011.10.012.

727

## 728 **Legends to figures**

729 **Figure 1 - Flow cytometry analysis of bone marrow-derived macrophages and**  
730 **their extracellular vesicles (EVs).** A, macrophages obtained by differentiation from  
731 bone marrow cells treated with GM-CSF were phenotyped with anti-F4/80 and anti-  
732 CD11b. 87.9% of the cells were double labeled. B, EVs with cell membranes labelled  
733 with PKH26. Curves with areas under them in black were produced by unlabelled EVs  
734 and with areas under them in gray were produced by labelled EVs. C, side scatter  
735 (SSC) and forward scatter (FSC) analysis showing the selection of the EV population,  
736 which is demarcated in the highlighted area. Beads (asterisk) with 1  $\mu\text{m}$  in diameter  
737 were used as reference. D, E, and F, EVs were labelled with anti-CD11b, anti-F4/80  
738 and anti-MHC type II. The curves with areas under them in black were produced by  
739 unlabelled EVs and curves with areas under them in gray were produced by labelled  
740 EVs. G and H, annexin V-labelled macrophages infected and uninfected on the 9th day  
741 of culture.

742

743 **Figure 2 – Macrophage viability and infection rate by *L. amazonensis*.** A 50  
744 parasites per macrophage ratio was used during the infection. A, percentage of  
745 chemical reduction of Alamar blue, relative to control, in macrophages infected with *L.*

746 *amazonensis*. B, kinetics of infection. To determine the rate of infection, the  
747 macrophages were grown on coverslips, stained with HE, and the amastigotes  
748 visualized by optical microscopy (at least 200 macrophages were analysed per  
749 coverslip). The horizontal lines represent the median values of hexaplicates (A) or  
750 triplicates (B), the boxes the interquartile intervals (A) or the range (B), and the vertical  
751 bars the ranges (A). \*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test.

752

753 **Figure 3 - Transmission electron microscopy of *L. amazonensis*-infected**  
754 **macrophages presenting with budding extracellular vesicles (EVs) and of EVs**  
755 **from supernatants of infected macrophage cultures.** A, EVs were adsorbed to  
756 copper grids (Formvar) for 20 minutes and negatively stained with 2 %  
757 phosphotungstic acid. Scale bar = 500 nm. B and C, micrographies of macrophages  
758 fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% and post-fixed with 1 %, osmium tetroxide, 0.8  
759 % potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride. The arrows indicate EVs being  
760 formed (B) and a *Leishmania* amastigote (C); the asterisk indicates the position of the  
761 remainings of a *Leishmania* amastigote (B). Scale bar = 2  $\mu$ m.

762

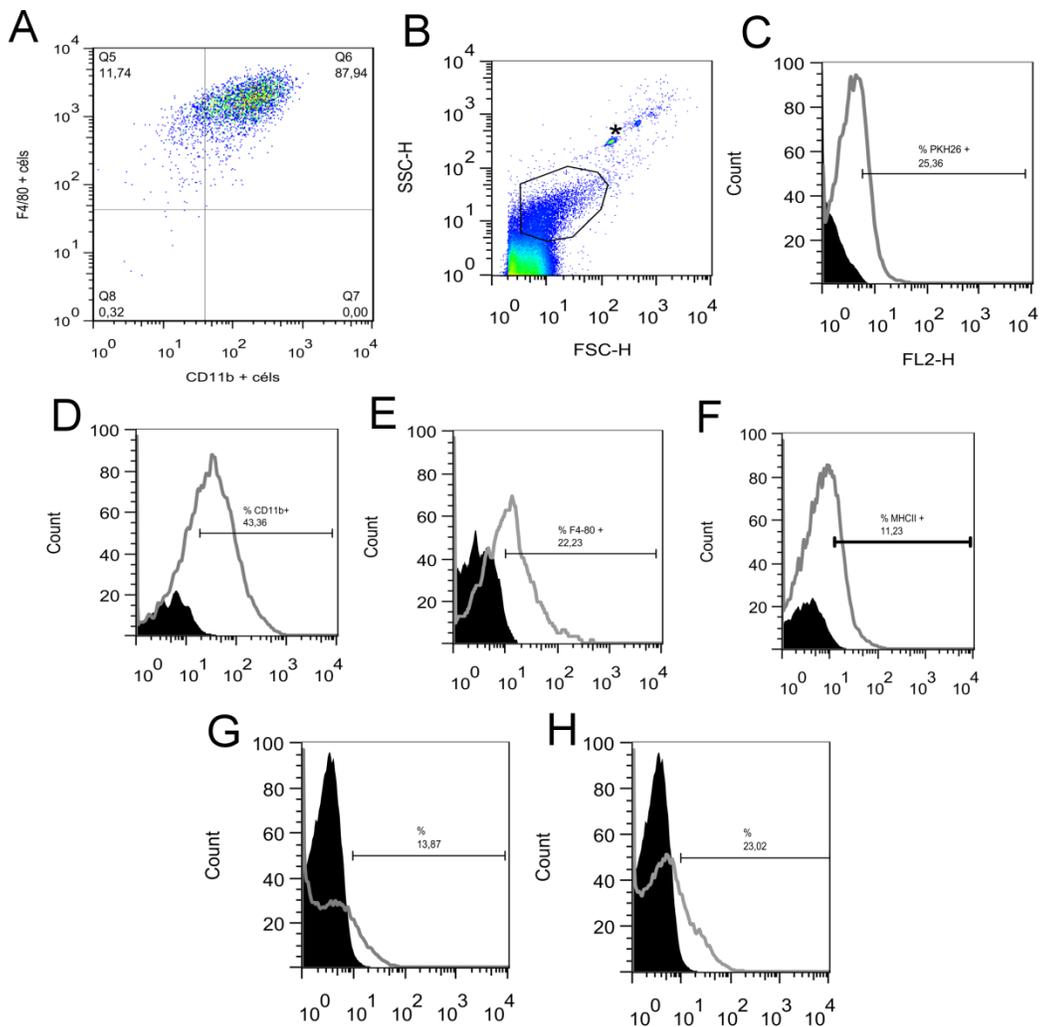
763 **Figure 4 - Effect of membrane vesicles from macrophages infected with *L.***  
764 ***amazonensis* (EVL<sub>a</sub>) or not (EV) and stimulated with LPS or not on cytokine**  
765 **production by naïve macrophages.** A and B, IL-12p70. C and D, IL-1 $\beta$ . E and F,  
766 TNF- $\alpha$ . G and H, IL-6. I and J, IL-10. A, C, E, G, and I, unstimulated macrophages; B, D,  
767 F, H, and J, macrophages stimulated with bacterium lipopolysaccharide for 48 hours. The  
768 symbols and lines represent the averages of replicates of individual experiment. Data

769 from six independent experiments are represented. Values obtained from cultures to  
770 which no EVs were added were subtracted from the data shown. \*,  $P < 0.025$ ;  
771 Wilcoxon's signed-rank sum test.

772

## 773 Figures

774 Figure 1

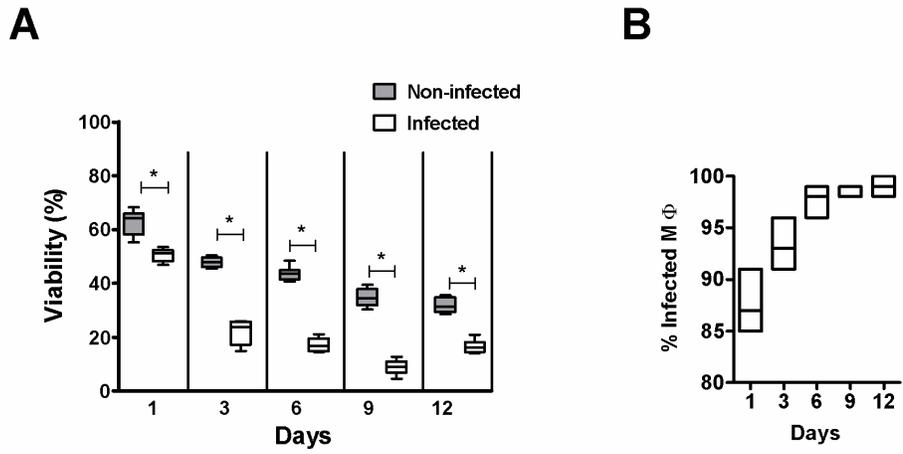


775

776

777

778 Figure 2



779

780 Figure 3

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

