

FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS
NA INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* E DE SEUS EFEITOS
IMUNOMODULADORES

TAISE CRISTINA SANTA BARBARA SILVA QUEIROZ

Salvador – Bahia

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS NA
INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis* E DE SEUS EFEITOS
IMUNOMODULADORES**

TAISE CRISTINA SANTA BARBARA SILVA QUEIROZ

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Indiani de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Queiroz, Taise Cristina Santa Barbara Silva.

Q113c Caracterização de vesículas extracelulares produzidas na infecção por *Leishmania braziliensis* e de seus efeitos imunomoduladores. / Taise Cristina Santa Barbara Silva Queiroz. - 2020.

64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de Enfermidades Infeciosas Transmitidas por Vetores.

Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Vesículas extracelulares. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Macrófagos. 4. Leishmaniose. I. Título.

CDU 616.993.161

**“CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS NA
INFECÇÃO POR LEISHMANIA BRAZILIENSIS E DE SEUS EFEITOS
IMUNOMODULADORES”.**

Taise Cristina Santa Barbara Silva Queiroz


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de outubro de 2020.

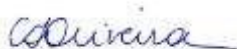
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Patrícia Xander Batista
Professora
UNIFESP



Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes
Fullam
Pesquisadora
FIOCRUZ



Dra. Camila Indiani de Oliveira
Pesquisadora
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz

A meus pais, familiares, amigos e professores com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção e iluminação na minha caminhada.

À minha preciosa família, especialmente a meus pais Maria Angélica e Francisco pelo amor, cuidado e dedicação em todos os dias da minha vida, e minha tia Ana pelo carinho e cuidado durante acolhida no seu lar.

À minha orientadora Dra. Camila Indiani. Obrigada por acreditar em mim, pela orientação e contribuição na minha formação mostrando conjunto diferentes de estratégias para resoluções de problemas técnicos-científicos. Aos colaboradores Dra. Ana Claudia Torrecilhas (UNIFESP) e Dr. Rodrigo Soares (IRR-FIOCRUZ MG) e Rafael Madeira (UNIFESP) pelas contribuições e discussões durante o trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho que ajudaram e contribuíram nos meus ensaios. Especialmente a Francys Rangel pelos conselhos e suporte na bancada.

Aos profissionais do LEITV por facilitarem o trabalho dos estudantes e contribuírem para um ambiente cada dia mais saudável, especialmente à Verena e a Andrezza de Souza.

Ao Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA e ao programa de Pós-graduação em Patologia, nas pessoas que deram suporte intelectual, administrativo, financeiro e oferecer a infraestrutura utilizada durante o trabalho.

À equipe da biblioteca do IGM pelo carinhoso apoio e à CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos os meus amigos que torceram por mim e pelo apoio, especialmente ao meu namorado, Philippe, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada!

QUEIROZ, Taise Cristina Santa Barbara Silva. Caracterização de Vesículas Extracelulares produzidas na infecção por *Leishmania braziliensis* e de seus efeitos imunomoduladores. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada e de amplo espectro clínico, causada por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Vários grupos relatam a liberação de vesículas extracelulares (VEs) em espécies de *Leishmania*, tais partículas têm a função principal de comunicação celular, exercendo efeitos na interação parasita-hospedeiro e entre os parasitas. Além disso, experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram o enriquecimento de VEs com biomoléculas, como fatores de virulência, fundamentais no processo infeccioso. **OBJETIVO:** Caracterizar as VEs secretadas por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e avaliar o efeito da estimulação das células com essas VEs, em termos de carga parasitária e produção de citocinas. **MATERIAL E MÉTODOS:** As VEs foram obtidas de culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e isoladas por centrifugação diferencial seguida de ultracentrifugação. As VEs foram caracterizadas por MEV, MET e *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), por fim realizamos ensaios funcionais de estimulação das células com VEs. **RESULTADOS:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura sugerem que a liberação das VEs ocorre em todo o corpo celular de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. A NTA mostrou que VEs obtidas de macrófagos infectados por 24 horas têm um diâmetro médio de 150,48 nm. A NTA também mostrou que a quantidade de VEs produzidas pelos macrófagos infectados foi semelhante ($152,35 \times 10^8$ VE/ml) à observada nos macrófagos controle ($125,83 \times 10^8$ VE/ml), às 24h. A estimulação de células com 10^8 VEs/ml, obtida de macrófagos controle ou infectados, reduziu significativamente a carga parasitária de macrófagos após subsequente infecção por *L. braziliensis*. Paralelamente, a estimulação de macrófagos com 10^8 VEs/ml (independente da origem da VE), seguida de infecção por *L. braziliensis*, reduziu a produção de TNF quando comparada às culturas que permaneceram sem estimulação. **CONCLUSÕES:** Este trabalho fornece uma nova perspectiva sobre a produção de VEs por células infectadas com *L. braziliensis* e abre uma nova via de investigação sobre seu papel imunomodulador na leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, *Leishmania braziliensis*, Macrófagos, leishmaniose

QUEIROZ, Taise Cristina Santa Barbara Silva. Characterization of Extracellular Vesicles to macrophages infected with *Leishmania braziliensis* and its immunomodulatory effects. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis is a neglected tropical disease with a wide clinical spectrum, caused by protozoa parasites of the genus *Leishmania*. Several groups report the secretion of extracellular vesicles (EVs) in *Leishmania species*, such particles have the main function of cellular communication, exerting effects on the parasite-host interaction and between the parasites. In addition, *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrate the enrichment of EVs with biomolecules, as virulence factors, fundamental in the infectious process. **OBJECTIVE:** Characterize the EVs secreted by murine macrophages infected with *L. braziliensis* and to evaluate the effect of stimulation of cells with these EVs, in terms of parasitic load and cytokine production. **MATERIALS AND METHODS:** EVs were obtained from macrophage cultures infected with *L. braziliensis* and isolated by differential centrifugation followed by ultracentrifugation. EVs were characterized by SEM, MET and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), finally performed functional tests to stimulate cells with EVs. **RESULTS:** Scanning electron microscopy images suggests that EV release occurs throughout the cell body of macrophages infected with *L. braziliensis*. NTA showed that EVs obtained from macrophages infected for 24 hours have an average diameter of 150.48 nm. NTA also showed that the amount of EVs produced by infected macrophages was similar (152.35×10^8 VE/ml) to that observe in control macrophages (125.83×10^8 VE/ml), at 24h. Stimulation of cells with 10^8 EVs/ml, obtained from either control or infected macrophages significantly reduced the parasite load of macrophages upon infection with *L. braziliensis*. In parallel, stimulation of macrophages with 10^8 EVs/ml (regardless of the origin of the EV), followed by infection with *L. braziliensis* reduced the production of TNF when compared to cultures that remained without stimulation. **CONCLUSIONS:** This work provides a new perspective regarding the production of EVs by cells infected with *L. braziliensis* and opens a new avenue of investigation regarding its immunomodulatory role in cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Extracellular vesicle, *Leishmania braziliensis*, Macrophage, Leishmaniasis

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Os três tipos de vesículas extracelulares (VEs).	12
Figura 2. Vias de penetração das VEs nas células receptoras.	14
Figura 3. Fluxo esquemático para o isolamento de VE a partir dos sobrenadantes da cultura.	28
Figura 4. Taxa de infecção de macrófagos murinos por <i>L. braziliensis</i> .	32
Figura 5. Taxa de infecção de macrófagos murinos por <i>L. braziliensis</i> usando SFB depletado de VE.	33
Figura 6. Concentração de Vesículas Extracelulares (VEs) isoladas de culturas de macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> .	35
Figura 7. Distribuição do tamanho das VEs medidas por NTA.	36
Figura 8. Quantificação de VEs liberadas a partir de macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> .	38
Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> .	39
Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> .	40
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Transmissão das VEs liberadas de macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> .	41
Figura 12. Desenho experimental para avaliar os efeitos da estimulação de macrófagos com VEs, obtidas a partir de células infectadas com <i>L. braziliensis</i> .	41
Figura 13. Resultado da infecção por <i>L. braziliensis</i> em macrófagos expostos a VEs.	43
Figura 14. Fotomicrografias de macrófagos expostos a VEs e infectados com <i>L. braziliensis</i> .	44
Figura 15. Produção de citocinas em macrófagos estimulados vesículas extracelulares e infectados com <i>L. braziliensis</i> .	46
Figura 16. Concentração de proteína das VEs liberadas a partir de macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> .	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Cluster of Differentiation
CMV	Corpo Multivesicular
ESCRT	abreviatura do inglês <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
GFP	abreviatura do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glicofosfatidilinositol
HSP	Proteínas de Choque Térmico do inglês <i>Heat Shock Protein</i>
IL	Interleucina
LC / LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LM / LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral ou Calazar
MMP2	Matriz Metaloproteinase-2
NO	Óxido Nítrico
NTA	abreviatura do inglês <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PMA	Acetato de Forbol Miristato
PS	Fosfatidilserina
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSG101	proteína do gene 101 de susceptibilidade a tumor
VE	Vesícula Extracelular
VI	Vesícula Intraluminal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	11
1.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	16
1.3	VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR PROTOZÁRIOS E HELMINTOS	19
1.4	LEISHMANIOSE E VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	20
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	23
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	ANIMAIS	25
4.2	PARASITOS	25
4.3	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA ...	25
4.4	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	26
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS CÉLULAS MURINAS ..	26
4.6	ISOLAMENTO DE VE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO.....	27
4.7	ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULA	28
4.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) DAS VES ISOLADAS E DAS CÉLULAS MURINAS	29
4.9	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	29
4.10	ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS COM VESÍCULAS EXTRACELULARES (VE).....	30
4.11	DETECÇÃO DE CITOCINAS	30
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	32
5.1	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE VEs POR MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	32
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE VEs POR NTA	34
5.3	MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	38
5.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DAS VEs EM MACRÓFAGOS	42
5.5	COMPOSIÇÃO PROTÉICA	47
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	54
8	PERSPECTIVAS	55
	REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares (VEs) são definidas como nanopartículas extracelulares limitadas por bicamada proteolipídica com diâmetro médio de 20-1000 nm. Seu lúmen é rico em moléculas bioativas tais como, proteínas, lipídeos e material genético. A liberação e a comunicação mediada por VEs são evolutivamente conservadas nos organismos vivos visto que os três domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya) produzem VEs (<http://evpedia.info>). Atualmente, sabe-se que as VEs estão presentes em diversos fluídos corporais, como urina, leite materno, saliva, sangue e também no soro fetal bovino (CHOI et al., 2013). De acordo com a Sociedade de Vesículas Extracelulares, as VEs são partículas que não podem se replicar, ou seja, não contêm um núcleo funcional (THÉRY et al., 2018).

Inicialmente, não se sabia que a principal função biológica dessas partículas é a comunicação celular. Especificamente, as VEs originalmente relatadas em 1946 por Chargaff e West e referidas como "pó de plaquetas" por Wolf em 1967, foram observadas como partículas procoagulantes derivadas de plaquetas e presentes no plasma (Revisado por YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Os produtos sanguíneos, como plasma e soro, são comumente usados no estudo de VEs devido à facilidade de acesso e à relativa homogeneidade desses fluidos depois de processados. As VEs podem ser mais abundantes no soro do que no plasma (GEORGE et al., 1982), pois VEs séricas são liberadas pelas plaquetas durante o processo de coagulação que permite a obtenção de soro (GEMMELL; SEFTON; YEO, 1993). O isolamento das microvesículas do sangue sofre interferência pela presença de partículas de lipoproteínas e pequenas plaquetas com tamanho similar ao das microvesículas, pela alta viscosidade do sangue, pela presença de fibrinogênio e albumina (VAN DER POL et al., 2010).

A nomenclatura das VEs é extensa, mas geralmente são considerados três tipos principais: Exossomos, Ectossomos e Corpos Apoptóticos (Figura 1), os quais se diferenciam em função da sua biogênese e seu tamanho. Os exossomos cujo

tamanho é homogêneo, variando de 30-150 nm, são formados por meio de via intracelular: neste processo surgem vesículas intraluminais (VIs) no interior do endossomo inicial criando um corpo multivesicular (CMV). Este CMV pode se fundir com lisossomos e ser degradado ou pode, por via exocítica, se fundir com a membrana plasmática, liberando as VIs, as quais passam a serem denominadas de exossomos no meio extracelular (KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010). Por outro lado, os ectossomos ou microvesículas apresentam diâmetro heterogêneo, variando entre 100-1000 nm. Estes brotam diretamente da membrana plasmática por meio da perda de interação entre as proteínas do citoesqueleto e a membrana plasmática (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016). Por último, os corpos apoptóticos apresentam diâmetro entre 50-5000 nm e são liberados a partir da protrusão da membrana durante a apoptose (COLEMAN et al., 2001; KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016).

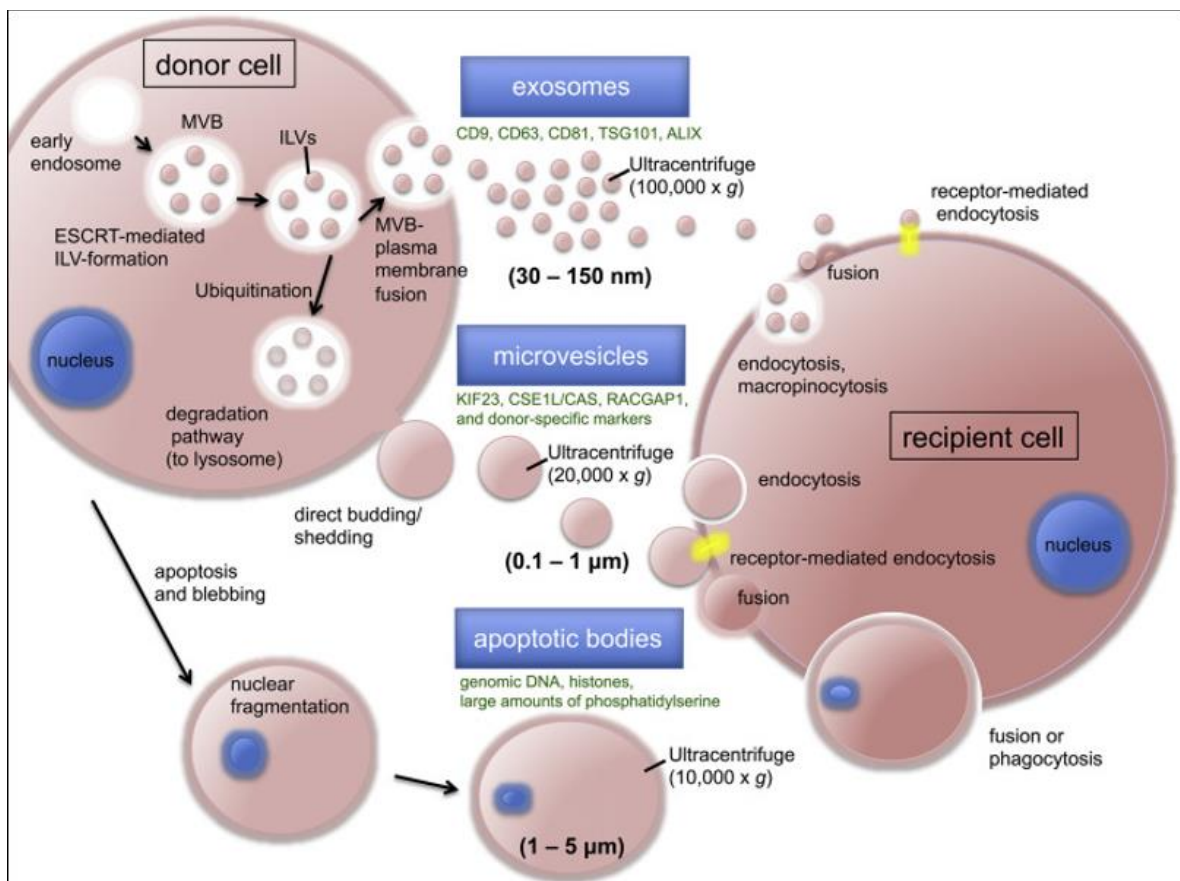


Figura 1. Os três tipos de vesículas extracelulares (VEs). Fonte: MCBRIDE; RODRIGUEZ-MENOCAL; BADIAVAS, 2017.

A comunicação intercelular se dá por meio da transferência de biomoléculas contidas nas VEs (VALADI et al., 2007). As VEs podem exercer efeitos funcionais nas células receptoras imediatamente ou após a fusão e a liberação de seus conteúdos (TORRECILHAS et al., 2012), assim, conhecer o processo de absorção de vesículas é relevante para o entendimento de certas fisiopatologias e também para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas. A absorção de VEs pode ser mensuradas por meio da quantificação do conteúdo das VEs, por meio da demarcação de proteínas de membrana com marcadores fluorescentes como GFP (FABBRI et al., 2012) ou ainda é possível utilizar corantes lipofílicos permeáveis à membrana das vesículas como o PKH 26 (CHRISTIANSON et al., 2013).

Na literatura, são reportadas diferentes vias de penetração das VEs no interior das células, tais como (Figura 2): (1) a endocitose clássica mediada por clatrina, (2) a endocitose mediada por bolsa lipídica, (3) a macropinocitose, (4) a endocitose dependente de caveolina, (5) a fusão de membrana e (6) a fagocitose. Na endocitose mediada por clatrina, a captação de VEs depende de energia pois é necessário o remodelamento do citoesqueleto celular de modo a formar invaginações, permitindo a ligação e o englobamento das VEs revestidas com clatrina. Na endocitose mediada por bolsa lipídica, as VEs são internalizadas pelos domínios das jangadas lipídicas, contudo, o mecanismo preciso ainda não foi elucidado (Revisado por MULCAHY; PINK; CARTER, 2014).

Na macropinocitose, as membranas são pregueadas como pequenas protuberâncias exteriorizadas que se projetam da superfície celular e envolvem as VEs (Revidado por MULCAHY; PINK; CARTER, 2014). Na endocitose dependente de caveolina, são formadas invaginações constituídas por caveolina e colesterol na membrana plasmática das células, assim, a oligomerização das caveolinas e os níveis elevados de colesterol permitem a formação de caveolas, e conseqüente formação de vesículas endocíticas que estão envolvidas na captação de VEs. Na fusão da membrana, as VEs interagem com a membrana plasmática, fusionam-se e entregam seu conteúdo no interior da célula. Até o momento, acredita-se que a captação de VEs parece ocorrer, majoritariamente, por meio de fagocitose e a extensão deste processo depende da capacidade fagocítica da célula receptora (Revisado por YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

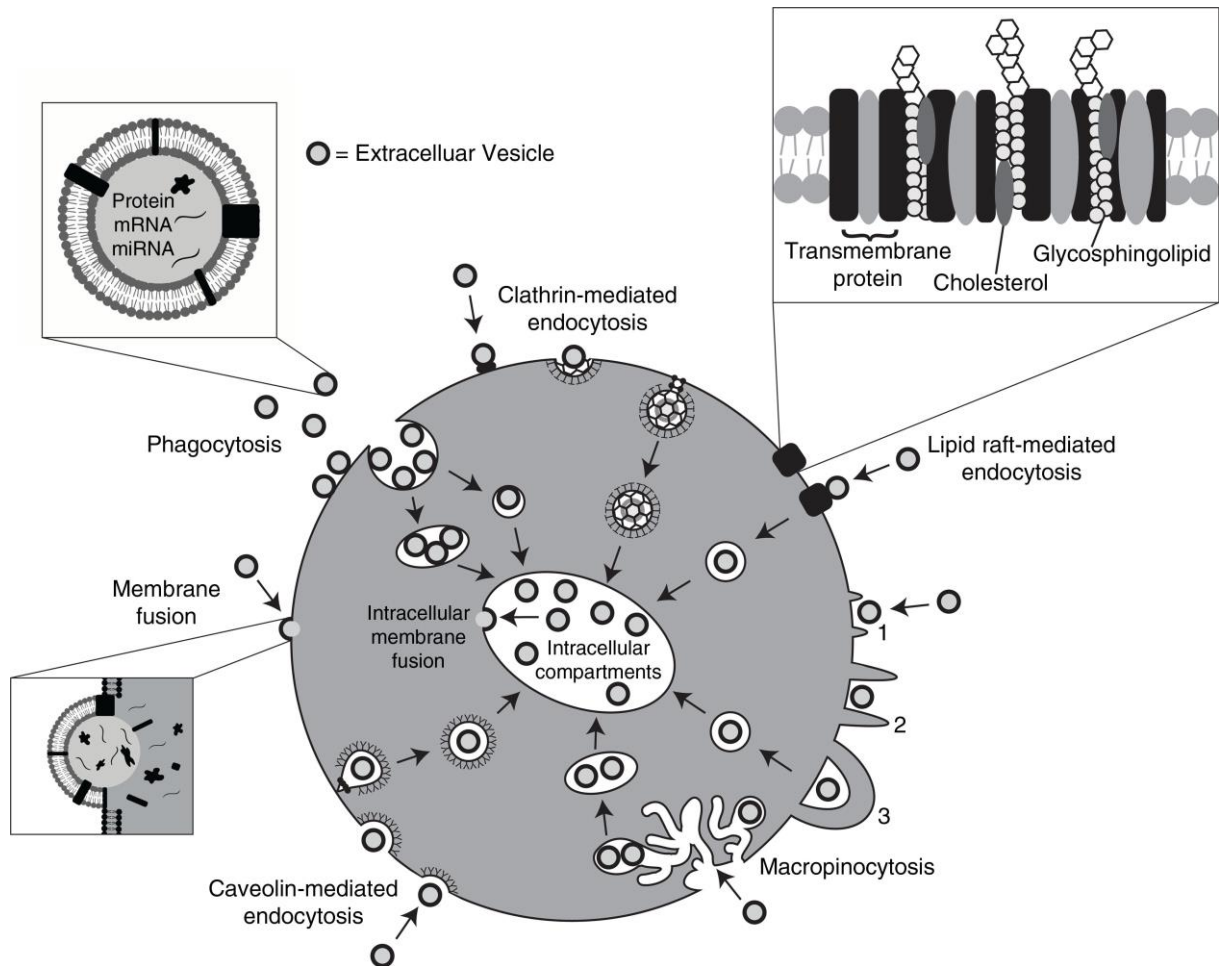


Figura 2. Vias de penetração das VEs nas células receptoras. Fonte: MULCAHY; PINK; CARTER, 2014.

A composição das VEs depende do tipo da sua célula que as origina (Revisado por WU et al., 2019). A carga de proteína dentro da VE pode ser caracterizada pelos métodos de Western blot e espectrofotometria de massa de alto rendimento (Tabela 1). Em geral, as VEs contêm proteínas citoesqueléticas, citosólicas, de choque térmico, da membrana plasmática e proteínas envolvidas no tráfico de vesículas. As tetraspaninas (CD63, CD81 e CD9) são encontradas nos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos e estão envolvidas na internalização das VEs, sendo potenciais biomarcadores (Revisado por YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Também é relatado um maior enriquecimento de CD9, CD63, anexinas, Alix e TSG101 em exossomos quando comparado com ectossomos (Revisador por KEERTHIKUMAR et al., 2015). Alix e TSG101 estão associadas a produção de corpo multivesicular (Revisado por DONG; FILHO; OLIVIER, 2019).

Tabela 1. Características principais dos três tipos de VEs

	Exossomos	Ectossomos	Corpos Apoptóticos
Tamanho	30-150 nm	100-1000nm	50-5000 nm
Biogênese	Formação de corpomultivesicular	Brotamento direto da membrana plasmática	Protusão da membrana durante a apoptose
Proteínas	CD63, CD81, CD9, alix, TSG101, anexinas, HSP, VPS24, VPS32, VPS36, Rabs	CD63, CD81, CD9, alix, TSG101, anexinas, MMP2, ARF6, VSP37D, Rabs	CD63, CD81, CD9, anexina V, histonas

Em geral, os exossomos consistem de diferentes proteínas associadas ao endossoma, por exemplo, as GTPases Rab ou proteínas incluídas na produção de corpomultivesicular (Alix, TSG101), além de apresentar proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70, HSP90), proteínas com atividade de adesão (tetraspaninas CD81, CD63, CD37), anexinas (I, II, V, VI), proteínas do citoesqueleto (actina, tubulina), enzimas metabólicas e proteínas com atividade de translação (Fatores de Alongamento 1, 2) ou sinalização (Revisado por DONG et al., 2019). Proteínas da maquinaria ESCRT (VPS24, VPS32 e VPS36) e anexina II foram identificadas exclusivamente nos exossomos (KEERTHIKUMAR et al., 2015). Os ectossomos apresentam principalmente MMP2 e ARF6. Uma proteína da maquinaria ESCRT (VPS37D) foi detectada exclusivamente nos ectossomos (Revisado por KEERTHIKUMAR et al., 2015). A carga dos corpos apoptóticos, por sua vez, não é bem caracterizada, mas sabe-se da presença dos marcadores de histonas de DNA e de Anexina V (Revisado por KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016; KEERTHIKUMAR et al., 2015; WU et al., 2019)

O conteúdo de RNA de VEs pode ser analisado por protocolos rápidos de PCR quantitativo. Os exossomos contêm RNAm e RNA não codificante, como miRNA, sendo que o miRNA de VEs pode ser uma ferramenta útil de diagnóstico de várias doenças (BELLINGHAM; COLEMAN; HILL, 2012; VALADI et al., 2007). As VEs

também podem conter RNAt, e principalmente RNAr (Revisado por YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

Quanto à membrana das VEs, tal como a membrana plasmática da célula, apresenta fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol. No entanto, a membrana plasmática apresenta fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina apenas na face interna da membrana, enquanto que nas VEs, a PS é encontrada nas faces interna e externa (KASTELOWITZ; YIN, 2014; OSTEIKOETXEA et al., 2015; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2009; YOON; KIM; GHO, 2014).

1.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

No isolamento das VEs presentes em sobrenadantes de cultura celular, é relevante observar uma série de fatores, como a viabilidade celular (VEs de células mortas podem contaminar as VEs derivadas de células vivas) e é aceitável a morte celular de até 5% para obter um isolado de VE puro (Revisado por WITWER et al., 2013). A quantidade e o conteúdo de VEs coletadas dependem do tipo de célula estudada (Revisado por JEPPESEN et al., 2014) e do tipo de subpopulação de VE (Exossomo, microvesículas ou corpos apoptóticos) de interesse (LUNAVAT et al., 2015). Ademais, o soro fetal bovino (SFB) contém VEs com características semelhantes às VEs derivadas das células de interesse, assim, é necessário remover essas vesículas do SFB antes de iniciar o processamento da cultura (SHELKE et al., 2014).

Substâncias químicas podem estimular a liberação de VE como por exemplo, o PMA (acetato de forbol miristato) e o ionóforo de cálcio. A presença destas substâncias pode então alterar as VEs liberadas em condições “naturais” (JEPPESEN et al., 2014). Outra preocupação no processamento de meios de cultura é a contaminação microbiana que além de infectar as células pode contribuir para liberação de VEs com composição diferente da original (BELLINGHAM; COLEMAN; HILL, 2012), e os sedimentos com VEs podem ser contaminados com microrganismos, por exemplo, micoplasma (CITTI; BLANCHARD, 2013).

A centrifugação diferencial é considerada o padrão-ouro para isolar VEs e desde a década de 80, utiliza-se a sedimentação sequencial de partículas com coeficientes de sedimentação decrescentes. A velocidade e o tempo são fatores importantes a serem considerados na centrifugação diferencial. A velocidade baixa ou alta e o tempo de centrifugação muito curto ou muito longo durante a etapa de isolamento de VEs promovem uma recuperação deficiente e um baixo rendimento. Portanto, escolher uma velocidade e um tempo apropriados são de grande importância. Em adição, as VEs pequenas possuem coeficientes de sedimentação menores e, desse modo, precisam de maior velocidade e maior tempo para serem obtidos (THÉRY et al., 2006). Geralmente, primeiro se realiza a centrifugação a 300 x g para sedimentar e remover células. Em seguida, o sobrenadante é centrifugado a aproximadamente 2.000 x g para sedimentar as VEs maiores, com 200-5000 nm, os corpos apoptóticos. Em seguida, o sobrenadante resultante é centrifugado a 10.000-20.000 x g para sedimentar microvesículas (100-800 nm). Este último sobrenadante então é usado para isolar os exossomos (40-150 nm), empregando-se uma força igual ou maior a 100.000 x g (CRESCITELLI et al., 2013).

O gradiente de densidade é um método com a finalidade de isolar e purificar as partículas com base em seu tamanho ou densidade. Este método é geralmente associado ao isolamento por ultracentrifugação, sendo que o gradiente de densidade pode aumentar a pureza das VEs. Vários fatores devem ser considerados no processamento de gradiente de densidade. Primeiro, o meio do gradiente, sacarose ou iodixanol: a sacarose tem alta viscosidade, alta osmolaridade e pode afetar a funcionalidade das VEs, enquanto que, o iodixanol tem baixa viscosidade, é iso-osmótico e não é tóxico para as VEs (IWAI et al., 2016). A posição de carregamento e o tempo de centrifugação também devem ser decididos previamente.

A Cromatografia de Exclusão por Tamanho, do inglês Size-Exclusion Chromatography (SEC), tem como princípio a separação de partículas baseada no seu tamanho. O sistema de filtração em um gel contendo esferas, é aplicado o material contendo as VEs de interesse. Moléculas pequenas (ex.: proteínas solúveis) podem entrar nas esferas ao passo que as partículas (VEs) maiores não entram, permitindo a seleção das VEs. A SEC permite isolar as vesículas do plasma sem a contaminação com lipoproteína de alta densidade (HDL) (BÖING et al., 2014). Em geral, a SEC não

apresenta o risco de se perder subpopulações, sendo uma excelente maneira de reduzir a contaminação por lipoproteínas, incluindo o HDL (BÖING et al., 2014). Por outro lado, esta técnica possui limitações associadas a caracterização proteica, devido ao pouco volume de amostra que pode ser carregado na coluna, além da interação da proteína com a coluna (BURGESS, 2018).

Existem diferentes técnicas para a caracterização e quantificação das VEs, após a sua obtenção pelos métodos citados acima. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), as células são cobertas com metais, assim quando os feixes de elétrons são dispersos pela amostra é possível gerar imagens tridimensionais da superfície dessas amostras, bem como é possível observar as estruturas internas das células, incluindo o citoplasma, o núcleo, organelas e elementos do citoesqueleto (DE SOUZA; ATTIAS, 2018). Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), é preciso seções finas ou amostras finas para que os elétrons possam atravessar e, em seguida, é possível gerar a imagem da estrutura interna. A MET por coloração negativa é uma técnica simples e rápida de preparar, sendo possível visualizar a forma das VEs (JUNG; MUN, 2018) e as proteínas de superfície (VALADI et al., 2007). A MET permite a visualização da bicamada lipídica e as proteínas podem ser encontradas no interior e exterior das VEs (JUNG; MUN, 2018).

A Análise de Rastreamento de Nanopartículas, do inglês *nanoparticle tracking analysis* (NTA), é um método para visualização direta e em tempo real de partículas em solução, que permite detectar a dispersão de luz das VEs por microscópio óptico, assim, o movimento browniano das partículas individuais é rastreado sendo possível calcular seu tamanho e sua concentração total (DRAGOVIC et al., 2011). As partículas maiores contribuem mais fortemente para a dispersão da luz do que as partículas menores, visto que vesículas liberadas por células humanas apresentaram diâmetro de 30-50 nm na análise por MEV e em torno de 110 nm por NTA (SOKOLOVA et al., 2011). Por outro lado, a técnica de NTA é mais sensível do que citometria de fluxo convencional, porque consegue mensurar partículas de 50 nm, enquanto que a citometria tem limite de detecção de aproximadamente 300 nm (DRAGOVIC et al., 2011).

1.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR PROTOZÁRIOS E HELMINTOS

As doenças parasitárias continuam ameaçar a saúde humana em todo o mundo, tais enfermidades incluem malária, esquistossomose, tricomoníase e leishmaniose (Revisado por WU et al., 2019). O longo período de coevolução dos parasitas e hospedeiros contribuiu com a habilidade desses organismos de conduzirem a homeostase fisiológica e imunológica de seus hospedeiros, favorecendo a sua sobrevivência (COAKLEY et al., 2017). Exemplo disso é a liberação de moléculas de sinalização, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (TWU et al., 2013; WU et al., 2017), por exemplo, por intermédio da liberação de VEs. Quando as VEs se fusionam com a membrana das células alvo e liberam o seu conteúdo no citoplasma da célula, exercem efeitos na interação parasita-hospedeiro e entre os parasitos.

Exossomos derivados de *Trichomonas vaginalis* são caracterizados pela presença de RNA e proteínas específicas do parasita, que são entregues as células hospedeiras provocando efeito imunomoduladores nas mesmas (TWU et al., 2013). Um estudo com *Trypanosoma cruzi* mostrou que as VEs transportam RNA e proteínas e transferem uma fração desses componentes aos parasitas e às células hospedeiras, com o envolvimento das VEs na transição do ciclo de vida de epimastigotas para formas de tripomastigota (GARCIA-SILVA et al., 2014). Observou-se também que o *T. cruzi* penetra seis a sete vezes mais em células incubadas com VEs derivadas do protozoário (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020).

A liberação de VEs por células infectadas pode induzir a modificação das células vizinhas, como foi verificado em *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Toxoplasma gondii* (BHATNAGAR et al., 2007). Exossomos secretados por células dendríticas contendo antígenos de *T. gondii* induziram proteção em camundongos CBA/J e C57BL/6 contra infecção (BEAUVILLAIN et al., 2007). As VEs derivadas de eritrócitos infectados com *P. falciparum* promovem a diferenciação do parasita são capazes de aumentar o número de gametócitos em cultura, de maneira dose-dependente (MANTEL et al., 2013).

As VEs liberadas por parasitas helmintos são extensivamente estudadas, incluindo VEs derivadas de *Ascaris suum*, *Trichuris muris*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni* e entre outros (Revisado por SOTILLO et al., 2020). O *S. mansoni* libera VEs contendo proteínas, como enzimas geradoras de energia e proteínas de choque térmico, as quais são importantes na interação parasita-hospedeiro (SAMOIL et al., 2018). Outro trabalho expõe que as VEs liberadas por *F. hepatica* podem prevenir a colite induzida por agente químico (sulfato de dextrano de sódio) em camundongos C57BL/6, por meio da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e redução da expressão do COX-2 e do NF- κ B (ROIG et al., 2018).

1.4 LEISHMANIOSE E VESÍCULAS EXTRACELULARES

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada com notificação em 102 países, sendo umas das infecções parasitárias mais prevalente no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por *Leishmania* com 12 milhões de doentes, resultando em 30.000 mortes por ano. Entre as 50 espécies do gênero de *Leishmania* reportadas, aproximadamente 20 são infecciosas aos humanos, de maneira que a transmissão acontece durante o hematofagismo do vetor invertebrado, que inoculam a forma extracelular, flagelada e móvel (promastigota) juntamente com vários componentes salivares na pele do hospedeiro vertebrado. Os promastigotas metacíclicos são então fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente por macrófagos, e se diferenciam em uma forma intracelular não móvel (amastigotas), que irá se multiplicar dentro fagolisossomo, romper a célula hospedeira e invadir outras células permitindo a progressão da infecção. O ciclo de vida do parasita completa após a ingestão de células infectadas com amastigotas pelo flebótomo durante a refeição sanguínea. (Revisado por BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; OLIVEIRA; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA, 2013).

A manifestação clínica da doença por ser classificada em Leishmaniose Visceral ou Calazar (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), esta última é subdividida em Leishmaniose Mucocutânea (LM ou LMC), Leishmaniose Cutânea Localizada (LC

ou LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Revisado por SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A LC é responsável por 1 milhão de novos casos por ano e a LV por 0,3 milhões de casos por ano. Nas Américas, a incidência anual estimada de LC varia entre 187.000 a 307.800 casos, enquanto que a ocorrência de LV é aproximadamente de 4.500 a 6.800 (Revisado por ALVAR et al., 2012).

Com relação às VEs, foi demonstrado que na infecção por *L. mexicana*, células infectadas liberam VEs e proteínas, como a metaloprotease GP63, que modulam a resposta do macrófago (HASSANI et al., 2011). O conteúdo das VEs secretadas por células infectadas por *L. mexicana* inclui uma grande quantidade de moléculas patogênicas, como a PTP e GP63 (HASSANI; OLIVIER, 2013). A GP63, também denominado de protease principal de superfície, é um fator de virulência abundante que se encontra expresso na superfície do protozoário ancorado ao glicofosfatidilinositol (GPI) ou diretamente secretado no meio extracelular (Revisado por ATAYDE et al., 2016). A GP63 promove a sobrevivência do parasita através da modulação da ação leishmanicida dos macrófagos, como a produção de NO (Revisado por YAO, 2010). A liberação de nanovesículas composta por GP63 foi reportada nas diferentes formas evolutivas de *L. infantum* (log, estacionária e metacíclica), sendo que a maioria dos subtipos de GP63 foram quantitativamente mais expressos nos exossomos de promastigotas metacíclicos e estacionários do que aqueles liberados por parasitas em crescimento logarítmico e menos infecciosos (MARSHALL et al., 2018). Outro fator de virulência LmPRL-1, que é uma PTP, é predominantemente expresso e secretado por promastigotas de *L. major* através da via exossomal (LEITHERER et al., 2017).

Na leishmaniose, a liberação de VEs é principalmente estudada em cultura de promastigotas. Silverman et al. (2010a) observaram a liberação de VEs em cultura de promastigotas de *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. major*, considerando tais vesículas como principal mecanismo de exportação de proteínas, visto que as proteínas identificadas nas VEs representam aproximadamente 52% da secreção total de proteínas pelo protozoário. Ademais, os autores observaram o brotamento de VEs na membrana fagolisossômica e no CMV, bem como, a exportação de vesículas para o citoplasma de células infectadas. Em adição, condições de estresse semelhantes

àquela encontrada na infecção do hospedeiro vertebrado ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm \text{pH } 5,5$) promovem aumento da liberação de VEs pelos promastigotas, com a presença de HSP 70 e HSP 90 (SILVERMAN et al., 2010a). O aumento na liberação de vesículas também foi observado após elevação da temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em promastigotas de *L. guyanensis in vitro* (ATAYDE et al., 2019).

Experimentos em camundongos BALB/c infectados com *L. mexicana* ou *L. panamensis* e co-inoculados com exossomos mostraram um aumento no tamanho da lesão, sendo um efeito ainda maior quando a *Leishmania* spp. foi co-inoculada com exossomos derivados de *L. guyanensis*, quando comparado a lesão dos camundongos infectados apenas o parasita (ATAYDE et al., 2019). Também foi mostrado que macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* liberam VEs em concentrações semelhantes àsquelas observadas nas células não infectadas. Tais VEs são caracterizadas por apresentar tamanho heterogêneo, com diâmetro variando de 50 a 300 nm. Além disso, foi relatado que as VEs induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-1 β e TNF- α por macrófagos não infectados, sugerindo uma polarização em favor de uma resposta que promove o controle da infecção (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014). Camundongos BALB/c co-inoculados com promastigotas de *L. amazonensis* e VEs apresentaram maior carga parasitária e aumento na progressão da lesão na pata quando comparado com animais infectados apenas com o parasita, também sugerindo uma resposta que favorece o crescimento do parasita (BARBOSA et al., 2018). Com relação ao vetor, Atayde et al. (2015) caracterizaram o papel de VEs secretadas pela *L. infantum* no lúmen do trato digestivo de *Lutzomyia longipalpis*, os autores observaram que, durante a picada do hospedeiro, as VEs são injetadas juntamente com parasita. Os autores também demonstraram que camundongos co-inoculados com parasitas e VEs apresentaram aumento significativo na expressão de citocinas, como IL-17, e lesões cutâneas maiores (ATAYDE et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A heterogeneidade na composição e biogênese das VEs contribui para variadas funções dessas vesículas (KOWAL et al., 2014; TKACH et al., 2017; TKACH et al., 2018). A principal função das VEs é a comunicação intercelular por meio do transporte de moléculas bioativas (TWU et al., 2013), tais como proteínas, lipídeos, glicoconjugados e ácidos nucleicos (CAMPOS et al., 2015). Além disso, as VEs secretadas por células infectadas incluem uma grande quantidade de moléculas patogênicas (ATAYDE et al., 2015). Foi observado que as VEs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-12 e IL-1 β in vitro, o que pode favorecer a resposta imune Th1 (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014).

Em relação a doença, a Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada com notificação em 102 países. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por Leishmaniose, com destaque para Leishmaniose Cutânea com 1 milhão de novos casos por ano. Os principais agentes etiológicos da LCL no Brasil são a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Até o momento, não se sabe a composição celular de VEs secretadas por macrófagos infectados com *L. braziliensis* e uma vez que esta espécie é responsável pelo amplo espectro clínico: cutânea, mucosa, disseminada e forma subclínica, torna-se interessante realizar estudos neste sentido. Nosso trabalho teve como objetivo caracterizar pela primeira vez as VEs secretadas por macrófagos infectados por *L. braziliensis* e avaliar seus efeitos imunomoduladores. Nossa hipótese é que macrófagos infectados com *L. braziliensis* produzem VEs as quais potencializam a infecção de outras células, atuando como mecanismos de virulência.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito imunomodulador de VEs liberadas por macrófagos infectados por *L. braziliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as VEs liberadas por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis*
2. Avaliar *in vitro*, a estimulação de macrófagos infectados ou não com *L. braziliensis* expostos às VEs

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade, foram obtidos do biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). Todos os animais foram mantidos em condições livres de patógenos e foram utilizados para experimentação de acordo com recomendações locais do Comitê de Ética em Cuidados e Utilização de Animais (CEUA) aprovado pelo protocolo CEUA-IGM-FIOCRUZ-L-008/2019.

4.2 PARASITOS

A cepa de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foi cultivada em Schneider's Insect Medium (Sigma) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SFB) inativado, 2 nM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Todos da Gibco, Brasil) a 26 °C. Promastigotas na fase estacionária foram utilizados em todos os experimentos de infecção de macrófagos.

4.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Macrófagos foram obtidos a partir de células retiradas da medula óssea de camundongos adaptado de Celes et al. (2016). Em resumo, o fêmur e a tíbia dos camundongos BALB/c foram dissecados, em seguida, foi removida a medula óssea através de uma corrente de meio RPMI 1660 suplementado com 10 % de SFB inativado, 2,5 % HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (todos da Invitrogen, Brasil) com auxílio de uma seringa e uma agulha. A suspensão celular obtida passada através de um filtro de 40 µM (Cell Strainer, BD Falcon), foi centrifugada a 1500 RPM por 10 min e ressuspensa no meio RPMI completo descrito acima. As células foram diferenciadas em placas de Petri com meio RPMI completo descrito acima com adição de 30 % de sobrenadante da cultura de células L929 como fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) durante 6-7 dias a 37 °C, com 5% CO₂. Os macrófagos diferenciados da medula óssea foram utilizados nos experimentos de infecção para isolamento de VEs e para os experimentos de estimulação com as VEs.

4.4 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS POR *L. BRAZILIENSIS*

As células obtidas como descrito acima foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 2,5 % HEPES, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% de SFB depletado de VEs (todos da Invitrogen, Brasil) inativado por calor, sendo determinado o número total de células viáveis em solução de Azul de Trypan e contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico para semear a uma densidade de 3×10^5 macrófagos por poço em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas circulares. Na cinética de infecção, as monocamadas de células receberam 3×10^6 promastigotas de *L. braziliensis* e foram incubadas a 37 °C em RPMI suplementado por 24h, em seguida os poços foram lavados e adicionado meio de cultura completo por mais 24h, 48h e 72h, logo após, as células foram lavadas, fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O número de células infectadas e de amastigotas intracelulares foi contado por microscopia óptica em 200 macrófagos. As culturas foram realizadas em triplicata (CELES et al., 2016). Para isolamento das VEs, o sobrenadante da cultura macrófagos infectados, assim como, o sobrenadante de macrófagos não infectados, foram coletados após 24h e 48h de infecção e armazenado a -80 °C até o processamento. Cada condição do experimento foi testada em replicadas de 8.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS CÉLULAS MURINAS

Macrófagos infectados com *L. braziliensis* e macrófagos não infectados foram fixados em solução fixadora de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.4 e armazenados a -4 °C. As amostras fixadas foram lavadas 3 vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 10 min em temperatura ambiente, em seguida, as amostras pós-fixadas em solução de ósmio a 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.4 por 30 min e foram lavadas 3 vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 10 min, a temperatura ambiente. As amostras foram então desidratadas em série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. As amostras desidratadas foram secas em equipamento Ponto Crítico Leica CPD 030 e, em seguida, foram montadas e revestidas com Au-Pd para visualização em MEV.

4.6 ISOLAMENTO DE VE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

O isolamento de VEs foi realizado por meio de centrifugação diferencial. Os sobrenadantes derivados das culturas de macrófagos infectados e de macrófagos controles foram centrifugados 300 x g por 10 min para retirar células. O sobrenadante resultante foi filtrado (filtros de 40 µM) e centrifugado a 2.100 x g por 10 min para eliminar células mortas. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 15.000 x g por 30 minutos para eliminar detritos celulares. Para o isolamento de VEs, este sobrenadante pré-processado foi centrifugado a 100.000 x g por 2h a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em PBS depletado-VE e lavado uma vez com PBS (também submetido a ultracentrifugação) para a eliminação de possíveis proteínas contaminantes. Em seguida, o material foi novamente ultracentrifugado a 100.000 x g por 2h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as VEs foi ressuscitado em 200 µL de PBS depletado de VEs (Figura 3). As alíquotas foram armazenadas a -80 °C. Os passos de ultracentrifugação foram realizados seguindo sempre recomendações dos fabricantes da ultracentrífuga Optima TLX Beckman, do rotor TLA-100.3 e dos tubos Thickwall Polypropylene (REF: 349623).

Células infectadas-*Lb* – coleta de sobrenadante

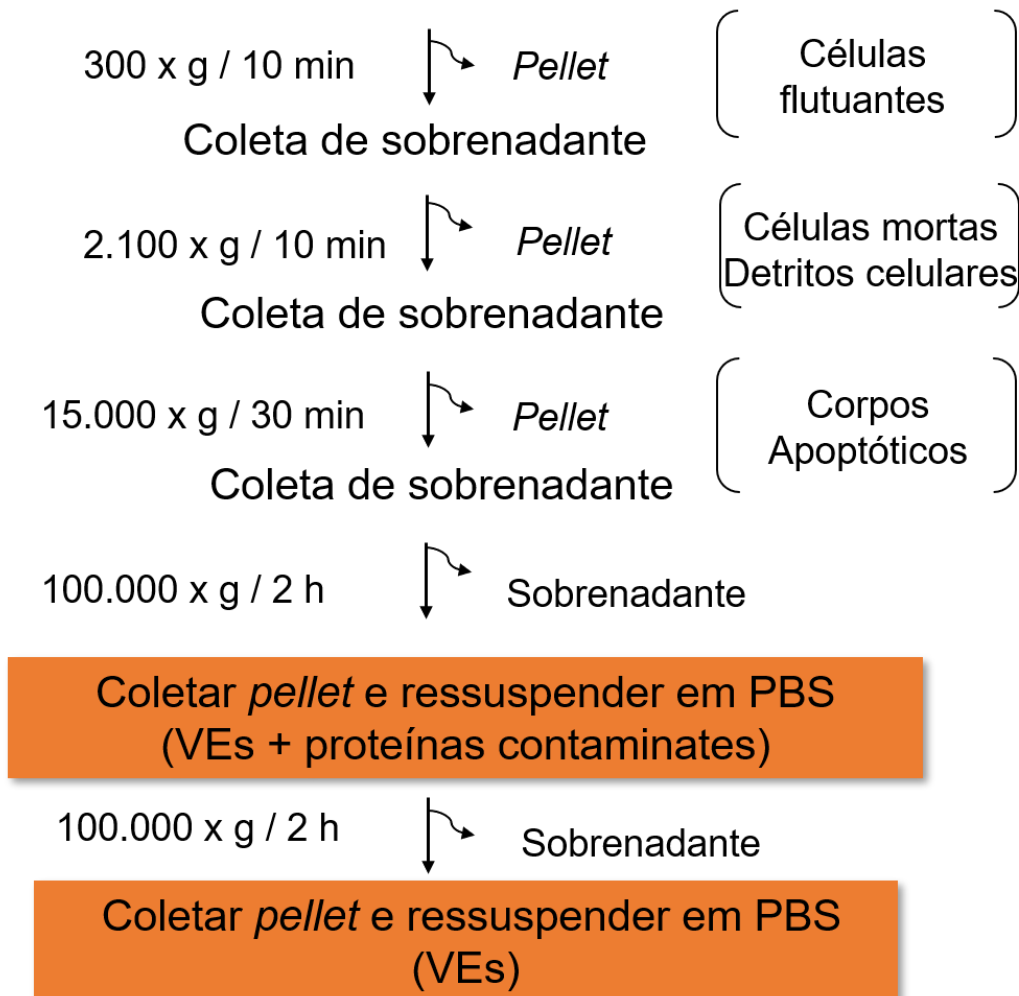


Figura 3. Fluxo esquemático para o isolamento de VE a partir dos sobrenadantes da cultura. As VEs foram isoladas dos sobrenadantes da cultura de macrófagos derivados da medula óssea infectados com *L. braziliensis* ou células não infectadas. Após 24 h, os sobrenadantes da cultura foram coletados e submetidos a uma rotação de baixa velocidade (300 x g / 10 min) para remover células. Posteriormente, centrifugações sequenciais consistindo em (2.100 x g / 10 min) para remover células mortas e restos celulares, seguidos por 15.000 x g / 30 min para remover corpos apoptóticos. Finalmente, foram realizadas duas centrifugações de 100.000 x g / 2h forma realizas para obter VEs. Após a última ultracentrifugação, VEs foram ressuspensas em PBS e utilizada na análise por NTA (Adaptado de Théry *et al.* 2006).

4.7 ANALISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULA

Para examinar a distribuição de tamanho e quantificar o número de VEs obtidas, a análise de rastreamento de nanopartícula do inglês *Nanoparticle Tracking*

Analysis (NTA) foi realizada usando a equipamento Nanosight. A análise foi realizada com as VEs isoladas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e isoladas de macrófagos controle, sendo que as suspensões de VEs foram diluídas 1:20 em PBS para otimizar a visualização das mesmas. O NTA foi configurado com o laser emitindo um feixe de 60 mW no comprimento de onda de 405 nm e uma câmera digital de alta sensibilidade foi acoplada produzindo vídeos analisados no programa NTA (3.2 Dev Build 3.2.16). A leitura dos vídeos foi realizada em triplicata com 25 quadros por segundo a 20 °C (RIBEIRO et al., 2018).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) DAS VES ISOLADAS E DAS CÉLULAS MURINAS

As células infectadas *L. braziliensis* e controles foram raspadas das placas de cultura com auxílio do *cell scraper*, centrifugadas por 1.200 RPM até formar um pelete, que então fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M durante a noite a 4 °C. Após lavagens no mesmo tampão, amostras foram incluídas em agarose ultrapura a 1%, pós-fixados com tetróxido de ósmio e desidratados em uma série de acetona graduada antes da incorporação em resina. Utilizando ultramicrótomo foram feitos cortes ultrafinos (70 a 80 nm) dos blocos de resina. As seções ultrafinas de cultura de macrófagos infectados foram visualizadas na MET JEOL JEM-1230. Adicionalmente, 20 µl de preparações de nanopartículas isoladas da cultura de células por ultracentrifugação foram fixadas com glutaraldeído a 4%, em seguida foram revestidas diretamente em grades de carbono Formvar por 1 min e coradas com acetato de uranila a 2% por 1 min. As grades Formvar cobertas com VEs isoladas foram visualizadas na MET JEOL JEM-1230 (ATAYDE et al., 2019).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Após isolamento das VEs, as amostras foram inicialmente liofilizadas. Para a liofilização, as soluções de PBS contendo VEs foram adicionadas a microtubos Eppendorf e congeladas no banho rápido, em nitrogênio líquido. As amostras foram liofilizadas (Labconco) em 5×10^{-1} mbar a -50°C, durante 3h. Após a liofilização, as amostras de oito experimentos diferentes foram juntadas e novamente

ressuspendidas em PBS. A quantificação proteica foi feita utilizando-se o kit micro BCA-Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Milão, Itália), seguindo as especificações do fabricante. A curva de calibração absorbância-concentração foi gerada usando albumina de soro bovino (BSA). A solução reagente de trabalho foi adicionada a cada amostra ou ao padrão (razão 1:1) e as amostras foram incubadas a 37°C por 2h. A absorbância foi medida a 562 nm com o leitor de microplacas. A concentração proteica das amostras liofilizadas foi calculada a partir da extrapolação dos valores obtidos na curva padrão.

4.10 ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS COM VESÍCULAS EXTRACELULARES (VE)

As células obtidas como descritas acima foram suspendidas em meio RPMI suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 10% de SFB depletado de vesículas extracelulares (todos da Invitrogen, Brasil) inativado por calor foram semeadas a uma densidade de 3×10^5 macrófagos em 300 μ l por poço em placas de cultura de 24 poços. Após 2 h, as células foram estimuladas ou não com VEs em diferentes concentrações (10^9 , 10^8 ou 10^7 VE/ml), respectivamente, corresponde a 1000, 100 e 10 VEs por macrófagos. Após 48 h, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20° C para posterior análise quanto à presença de citocinas. Em seguida, as células foram infectadas com 3×10^6 *L. braziliensis* por 24 h e os sobrenadantes também foram armazenados a -20° C para posterior análise da produção de citocinas. Avaliamos também a porcentagem de infecção e o número de amastigotas em 200 macrófagos fixados e corados com H&E, adicionalmente fotomicrografias foram geradas no microscópio óptico.

4.11 DETECÇÃO DE CITOCINAS

Níveis de TNF e IL-10 presentes nos sobrenadantes de cultura de macrófagos controle ou estimulados com VEs e posteriormente infectados com *L. braziliensis* foi mensurado por kits comerciais de ELISA. A presença de citocinas nos sobrenadantes foi quantificada seguindo as instruções do fabricante e a concentração foi determinada com interpolação com as curvas padrão.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de significância estatística foi calculada utilizando teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's, para comparações entre três ou mais grupos. As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney (teste T não paramétrico). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad (Prism) versão 7.0 e um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE VEs POR MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*

Inicialmente, a fim de delimitarmos o melhor tempo para coleta de VEs, infectamos macrófagos com *L. braziliensis* por diferentes tempos (24, 48, 72, 96 h) e determinamos a taxa de infecção. Observamos uma menor porcentagem de infecção nos tempos de 72h e 96h quando comparado a 24h ($p < 0.05$), enquanto que não houve variação significativa na porcentagem de infecção quando comparado os tempos de 24h e 48h (Figura 4A). Em relação ao número de amastigotas em 200 macrófagos, este significativamente foi maior após 24h de infecção; observamos em média 300 amastigotas por 200 macrófagos. Após este tempo, observamos uma diminuição do número de amastigotas, sendo esta significativa nos tempos de 72h e 96h (Figura 4B).

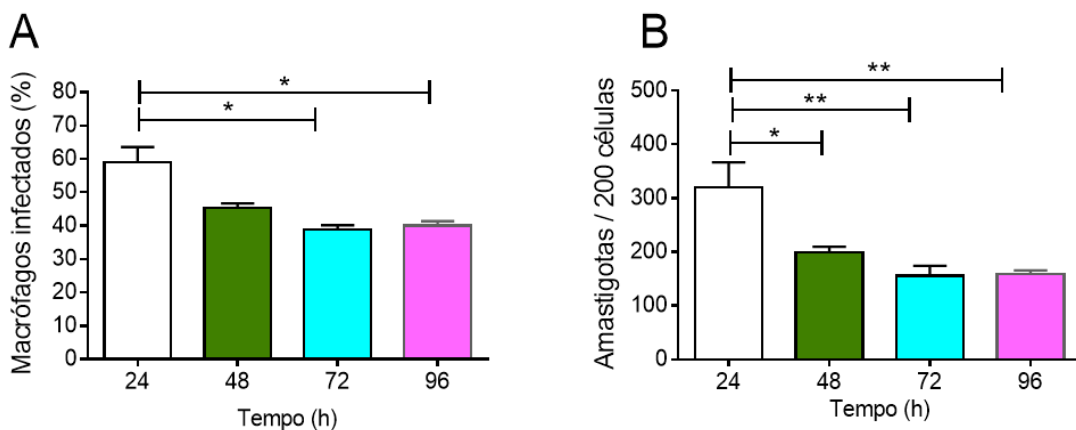


Figura 4. Taxa de infecção de macrófagos murinos por *L. braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* (10:1) por 24, 48, 72 e 96 horas. As células foram coradas com H&E e a porcentagem de células infectadas (A) e o número de amastigotas por 200 macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e são relativos a um experimento representativo, realizado em quadruplicata. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Multiple Comparison (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Uma vez que o SFB contém VEs, as quais podem interferir com o nosso objeto de estudo (VEs derivadas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*), avaliamos a taxa de infecção quando as células são cultivadas na presença de SFB depletado de

VEs. Em relação a porcentagem de infecção não houve variação significativa quando comparamos os tempos de 24h e 48h. Por outro lado, observamos uma diminuição significativa na taxa de infecção nos tempos de 72h e 96h (Figura 5A). Por fim, houve também uma diminuição significativa no número de amastigotas em 96h quando comparado a 24h (Figura 5B).

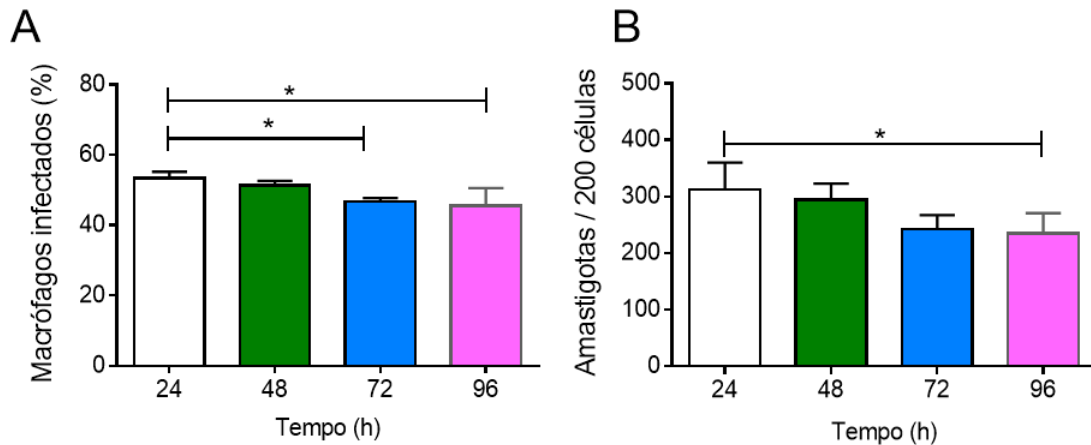


Figura 5. Taxa de infecção de macrófagos murinos por *L. braziliensis* usando SFB depletado de VE. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* (10:1) por 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando meio de cultura suplementado com SFB depletado por VE. As células foram coradas com H&E e a porcentagem de células infectadas (A) e o número de amastigotas por 200 macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. Os dados (média \pm SEM) são de um experimento representativo, realizado em quadruplicado. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e são relativos a um experimento representativo realizado em quadruplicata. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's Multiple Comparison (* $p < 0,05$).

De forma geral, observamos que a porcentagem de infecção e o número de amastigotas é significativamente maior no tempo de 24h. Observamos também que a suplementação do meio de cultura com SFB depletado de VE não alterou a porcentagem de infecção nem o número de amastigotas, com as maiores taxas de infecção exibidas nos tempos de 24h e 48h. Dessa forma, escolhemos esses tempos para a coleta dos sobrenadantes para o posterior isolamento das VEs.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE VEs POR NTA

Uma vez avaliada a cinética de infecção dos macrófagos com *L. braziliensis* e tendo decidido os tempos de 24 e 48h como alvos da nossa análise, coletamos os sobrenadantes de cultura, os quais foram processados e ultracentrifugados para o isolamento das VEs e posterior caracterização por NTA. A partir dos resultados obtidos quanto ao número de VEs presentes no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis*, realizamos então uma bateria de experimentos de infecção (24h) para a obtenção de VEs. Novamente, os sobrenadantes de cultura foram coletados e ultracentrifugados. As análises de NTA mostraram o tamanho heterogêneo das VEs presentes nos sobrenadantes, embora existam picos mais expressivos representando o diâmetro de maior frequência na população amostral (Figura 6).

A figura 8 exibe os resultados obtidos nas três replicatas técnicas da análise por NTA. As triplicatas técnicas dos macrófagos não infectados foram sobrepostas apresentando diâmetro médio homogêneo de 127,6 nm (Figura 6A). Os macrófagos infectados também secretaram VEs e observamos dois picos mais expressivos, assim, o primeiro com VEs de diâmetro de 132 nm e o segundo com VEs de diâmetro de 163 nm proporcionando um média de 141,8 nm (Figura 6B). As triplicatas do meio de cultura revelaram duas populações de partículas distintas, com diâmetros menores, de 75 nm e 122 nm (Figura 6C).

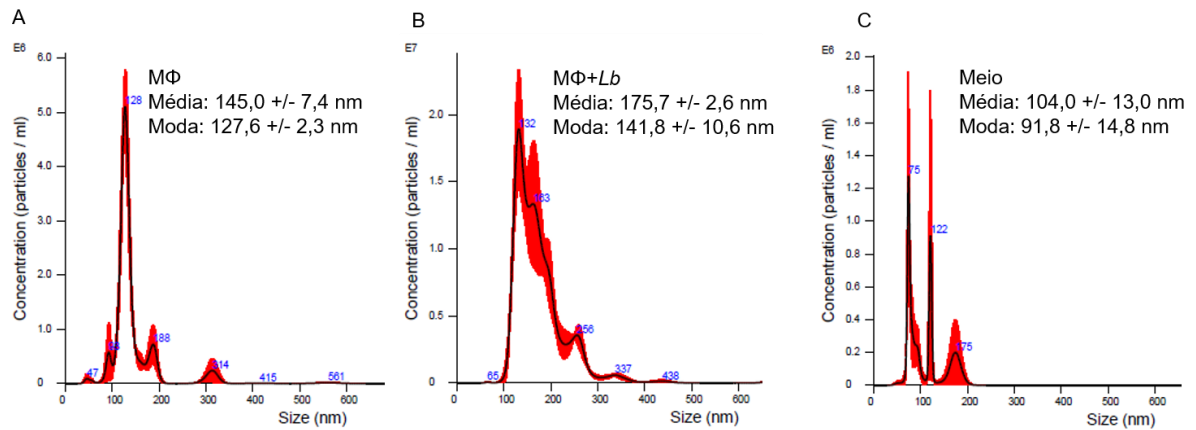


Figura 6. Concentração de Vesículas Extracelulares (VEs) isoladas de culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. As células foram infectadas com *L. braziliensis* por 24h. VEs foram isoladas por ultracentrifugação de sobrenadantes de cultura e quantificadas por análise de rastreamento de nanopartículas usando NanoSight NS300. Histogramas do tamanho e da concentração foram determinados para VEs presentes no sobrenadante de cultura de (A) Macrófagos não infectados, (B) Macrófagos infectados ou presentes em (C) meio de cultura. Observamos a média da triplicata de um experimento representativo.

Para melhor visualização dos tamanhos das VEs analisadas por NTA, dividimos os mesmos em classes (Figura 7). Macrófagos controle (Figura 7A) e macrófagos infectados com *L. braziliensis* por 24h (Figura 7B) apresentaram maior concentração de partículas entre 123,5 e 147,5 nm.

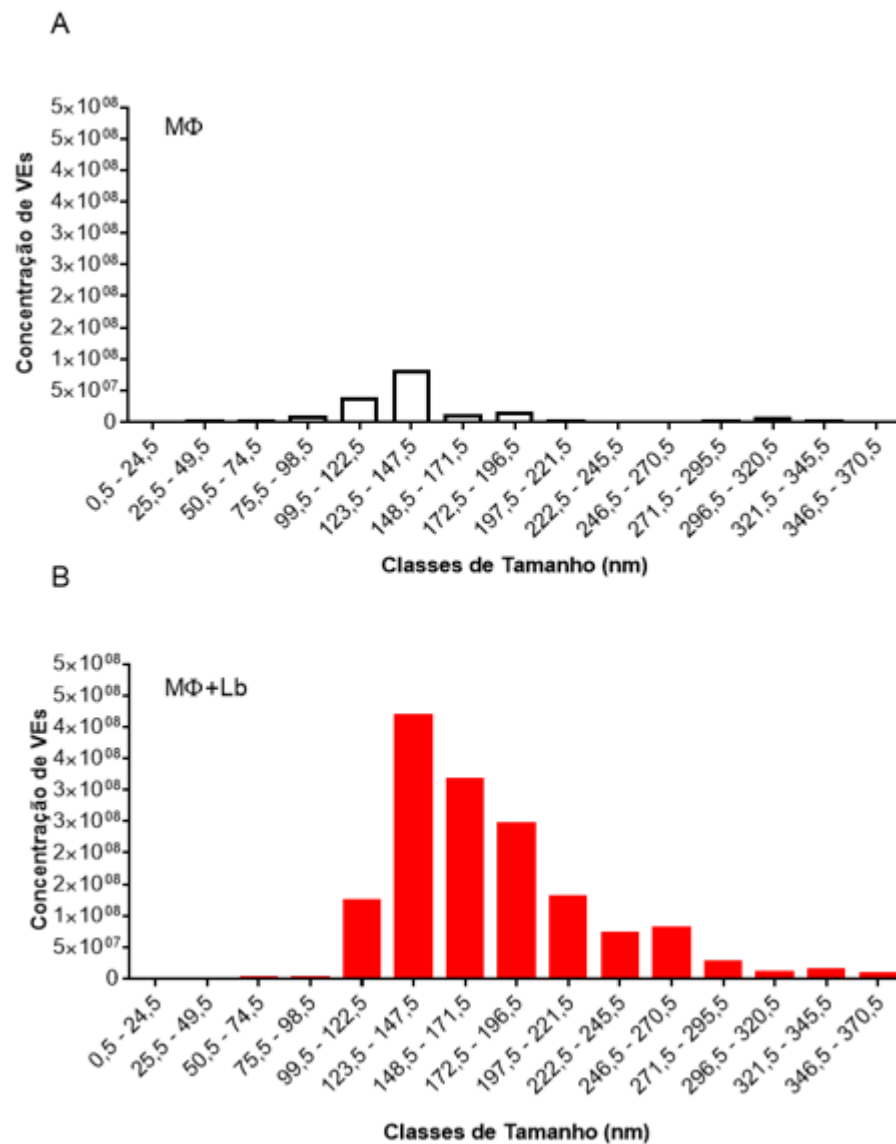


Figura 7. Distribuição do tamanho das VEs medidas por NTA. As VEs foram agrupadas em 25 classes de tamanho (nm) pela concentração média de VEs presentes no sobrenadante de cultura de (A) Macrófagos não infectados e (B) Macrófagos infectados com *L. braziliensis* por 24h. Observamos a média da triplicata de um experimento representativo.

A análise por NTA revelou que a taxa de liberação das VEs varia com a presença do parasita (células infectadas) e com o tempo de infecção (Figura 8). A quantidade de partículas encontradas nos macrófagos infectados foi semelhante ($152,35 \times 10^8$ VE/ml) à encontrada em macrófagos não infectados ($125,83 \times 10^8$ VE/ml), no tempo de 24h. Por outro lado, macrófagos infectados por 24h apresentaram aproximadamente seis vezes mais partículas ($152,35 \times 10^8$ VE/ml) quando comparado com o tempo de 48h ($26,55 \times 10^8$ VE/ml). Após 48h, observamos que a liberação de partículas diminuiu e se aproxima daquela detectada nos controles - PBS ($38,72 \times 10^8$ VE/ml) e o meio de cultura completo ($31,72 \times 10^8$ VE/ml) (Figura 8A). De maneira geral, a análise por NTA nos mostrou que os macrófagos infectados com *L. braziliensis* por 24h produzem VEs em quantidades superiores quando comparado com o tempo de 48h. Por essa razão decidimos realizar os experimentos de isolamento de VE apenas no tempo de 24h.

A análise por NTA também permitiu determinar o tamanho médio das partículas das amostras, a qual foi menor nos macrófagos infectados por 24h (150,48 nm) do que nos macrófagos não infectados (155,91 nm) ou encontradas em PBS (184,36 nm) (Figura 8B). Macrófagos infectados por 48h (126,25 nm) também exibiram menor tamanho do que os não infectados (137,98 nm) (Figura 8B). Em paralelo, mostramos que a porcentagem de células infectadas (Figura 8C) e o número de amastigotas (Figura 8D) não variaram significativamente entre os experimentos independentes analisados.

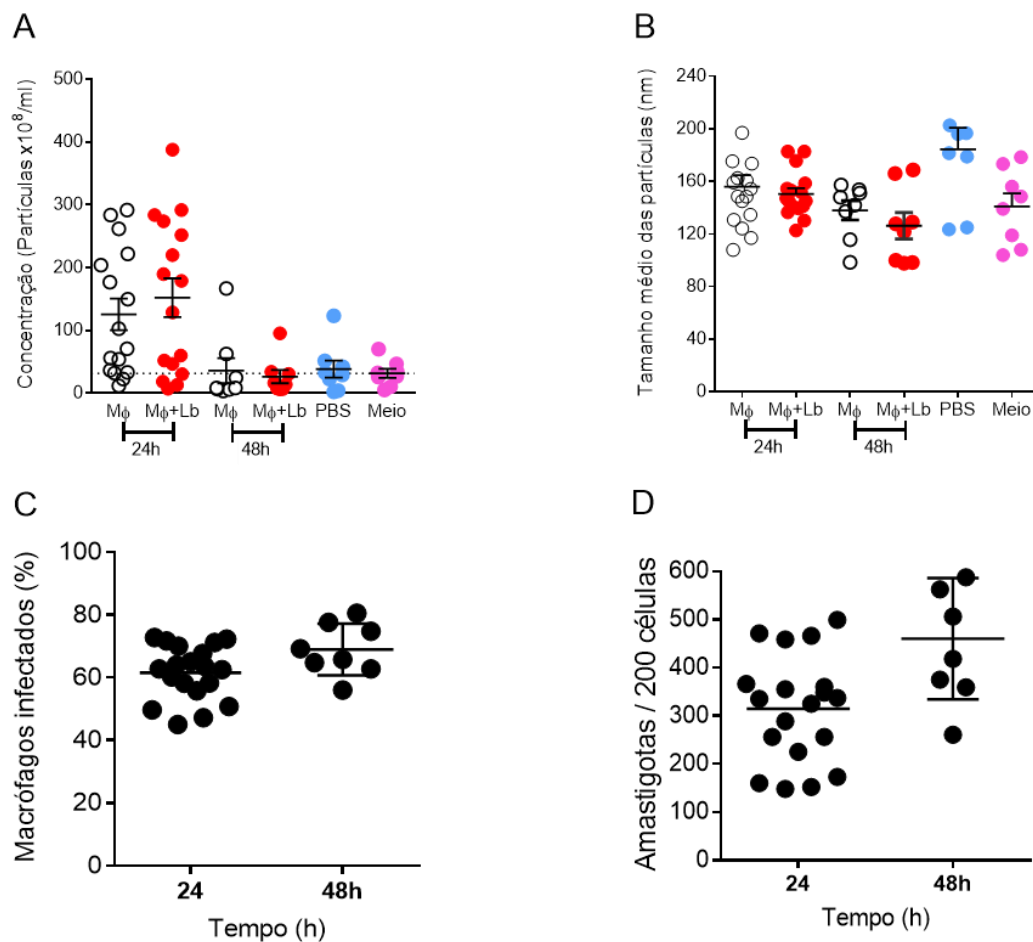


Figura 8. Quantificação de VEs liberadas a partir de macrófagos infectados por *L. braziliensis*. As células foram infectadas com *L. braziliensis* por 24h. As VEs foram isoladas por ultracentrifugação de sobrenadante de cultura e quantificadas por análise de rastreamento de nanopartículas utilizando NanoSight NS300. (A) Concentração de VEs e (B) Tamanho médio de VEs em macrófagos controle (CTR) ou infectados com *L. braziliensis* (Lb). Controles negativos: PBS e meio de cultura (cRPMI). As células também foram coradas com H&E para determinar (C) a porcentagem de células infectadas e (D) o número de amastigotas por 200 macrófagos por microscópio óptico. Os dados são apresentados como média \pm desvio dos experimentos, cada um realizada em triplicado.

5.3 MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS*

Uma vez avaliada a cinética de infecção dos macrófagos com *L. braziliensis* e quantificado a concentração por NTA, partimos para verificar a morfologia das células infectadas, a fim de detectar a presença de VEs. De fato, as VEs foram produzidas com êxito por macrófagos infectados com *L. braziliensis* (Figura 9). As micrografias (Figura 9A e B) confirmaram a liberação de VEs, esferóides redondos, por todo o corpo

celular dos macrófagos infectados, tanto no tempo de 24 quanto 48h. A presença das VEs é menor nas células controle, não infectadas (Figura 9C e D). Em paralelo, mostramos que a porcentagem de células infectadas (Figura 9E) e o número de amastigotas (Figure 9F) não variaram significativamente entre os dois tempos analisados, neste experimento. Nossos resultados mostram que macrófagos infectados com *L. braziliensis* produzem VEs, tanto no tempo inicial (24h) quanto no tempo mais tardio (48h).

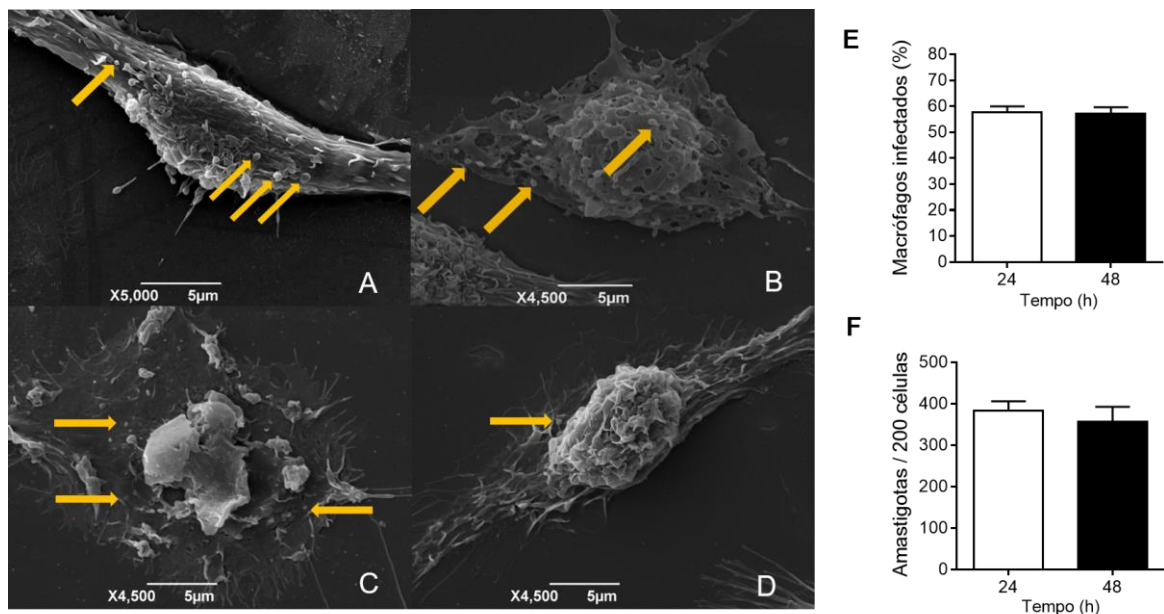


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de macrófagos infectados por *L. braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* (10:1) por (A) 24 e (B) 48 horas. As células controle (C e D) não foram infectadas. As setas amarelas indicam a liberação de vesículas extracelulares. As células foram avaliadas quanto (E) à porcentagem de infecção e (F) ao número de amastigotas/200 células por microscopia óptica. Os dados (média \pm desvio padrão) são de um experimento representativo realizado em triplicata.

Adicionalmente, é possível sugerir a liberação das VEs em macrófagos infectados por meio das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 10). Observamos por coloração negativa uma população heterogênea de VEs em células infectadas com *L. braziliensis* (Figura 10A-C) e em células controle, principalmente na região próxima à sua membrana plasmática (Figura 10 D-F).

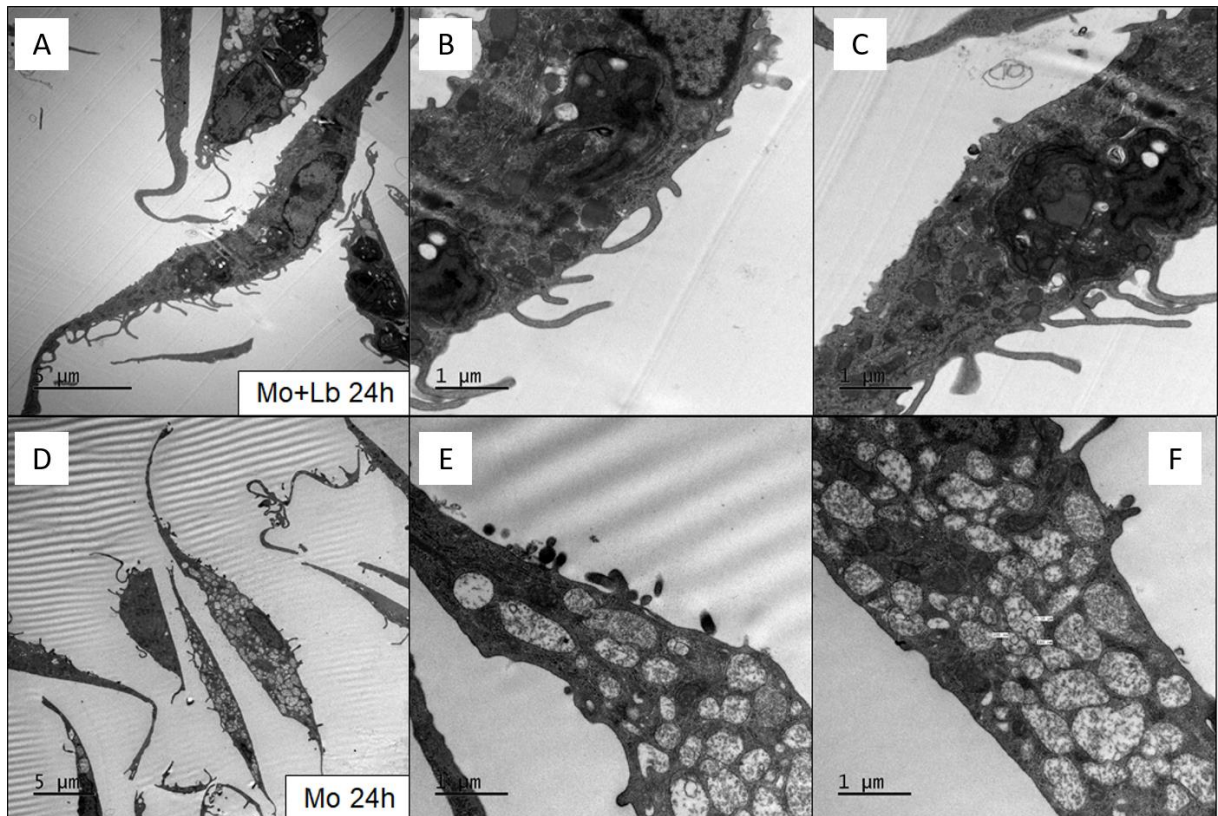


Figura 10. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados por *L. braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* (10:1) por 24h. (A, B e C) células infectadas e (D, E e F) células não infectadas. Barra de escala = 5 μm e 1 μm.

Para confirmar a presença das VEs na preparação de PBS com nanopartículas isoladas e em suspensão visualizamos por microscopia eletrônica de transmissão (MET), tais partículas formam uma população com tamanho heterogêneo e morfologia esferoide (Figura 11).

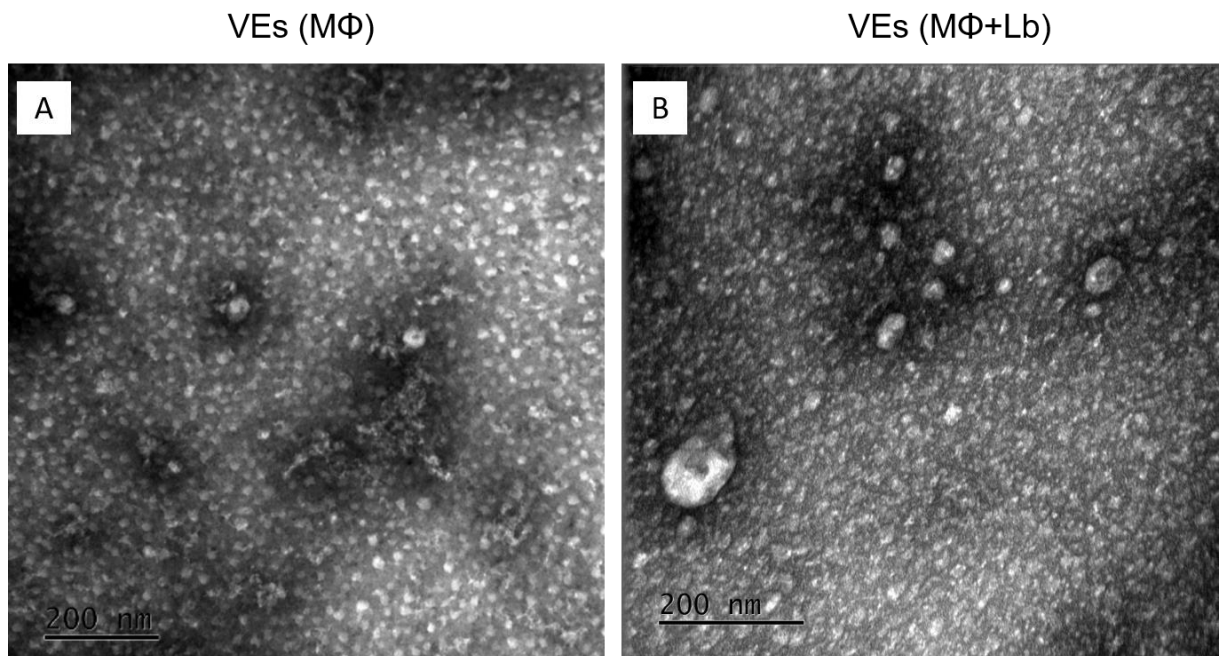


Figura 11. Microscopia Eletrônica de Transmissão das VEs liberadas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. As VEs foram obtidas de (A) células não infectadas e (B) células infectadas, após 24h. As VEs foram adsorvidas a grades de cobre (Formvar) por 1 minuto e coradas negativamente com acetato de uranila a 2%. Barra de escala = 200 nm.

A partir destes resultados, partimos para experimentos de estimulação, nos quais os macrófagos são expostos às VEs obtidas de células infectadas. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos desta exposição sobre a infecção por *L. braziliensis*. Os experimentos de estimulação de células com VEs foram realizados conforme descrito na Figura 12.

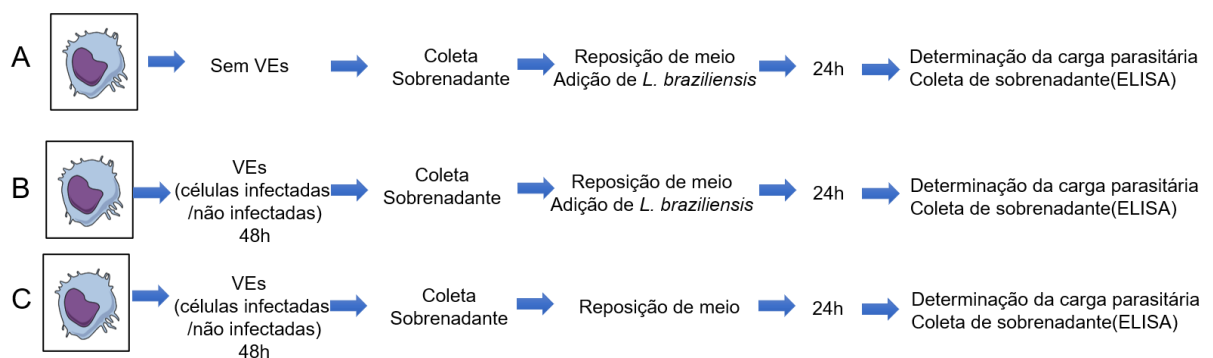


Figura 12. Desenho experimental para avaliar os efeitos da estimulação de macrófagos com VEs, obtidas a partir de células infectadas com *L. braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea foram estimulados com VEs obtidos a partir de células infectadas com *L. braziliensis*. (A) As células não estimuladas e posteriormente infectadas com *L. braziliensis*

por 24h. (B) As células estimuladas com VEs por 48h e posteriormente infectadas com *L. braziliensis*. (C) As células estimuladas com VEs por 48h apenas.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DAS VEs EM MACRÓFAGOS

Para investigar a influência das VEs na resposta inata de macrófagos, avaliamos a cinética de infecção após estimular em células com diferentes concentrações de VEs (10^9 , 10^8 e 10^7 VEs/ml) (Figura 13). Não houve mudança significativa na taxa de infecção quando os macrófagos foram estimulados com 10^7 VEs/ml e posteriormente infectados com *L. braziliensis* (Figura 13A e B). Quando as células foram estimuladas com 10^8 VEs/ml - obtidas de células não infectadas - observamos uma redução no número de amastigotas (Figura 13C e D), assim como, quando as células foram estimuladas com 10^8 VEs/ml - obtidas de células infectadas - observamos uma redução no número de amastigotas (Figura 13D). Por fim, quando as células foram estimuladas com 10^9 VEs/ml - obtidas de células infectadas - também observamos uma redução no número de amastigotas (Figura 13F). Estes resultados indicam que as concentrações de 10^8 e 10^9 VE/ml reduzem a quantidade de amastigotas em macrófagos estimulados com VEs.

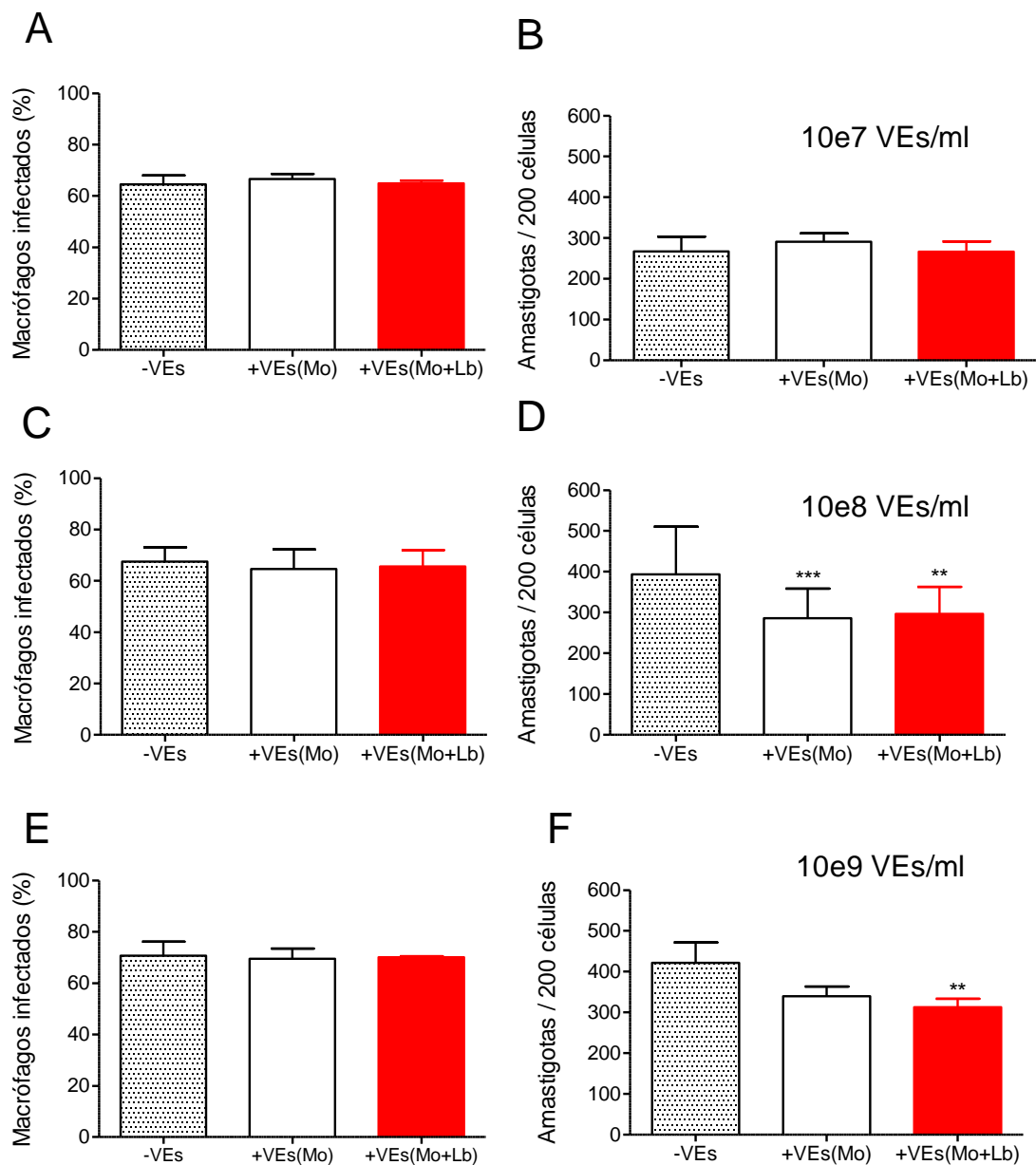


Figura 13. Resultado da infecção por *L. braziliensis* em macrófagos expostos a VEs. Macrófagos derivados da medula óssea foram estimuladas com 10⁷ (A, B), 10⁸ (C, D) ou 10⁹ VEs/ml (E, F) obtidas de células não infectadas (Mo) ou obtidas de células infectadas por *L. braziliensis* (Lb). Como controle, células foram mantidas sem estímulo. Após 48h, as células foram infectadas com *L. braziliensis* (10:1) por 24h. Em seguida, foram avaliadas a porcentagem de células infectadas (A, C e E) e o número de amastigotas por 200 macrófagos por microscopia ótica (B, D e F). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

Fotomicrografias das células estimuladas com VEs e infectadas com *L. braziliensis* confirmam uma menor presença de amastigotas nas células estimuladas

com VEs obtidas de macrófagos controle (Figura 14B) e VEs obtidas de macrófagos infectados (Figura 14C) quando comparado com células não estimuladas e infectadas com *L. braziliensis* (Figura 14A). As células estimuladas com VEs e não infectadas apresentaram mesmo aspecto independente da origem das VEs (Figura 14D).

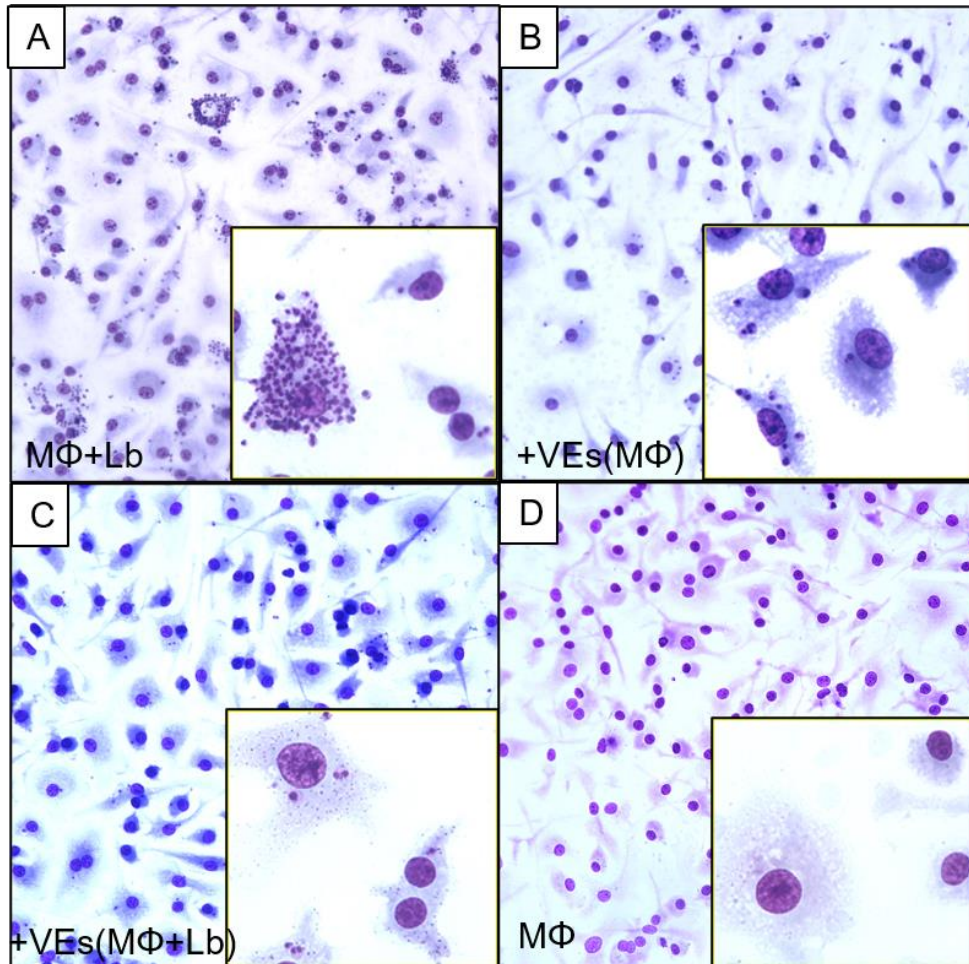


Figura 14. Fotomicrografias de macrófagos expostos a VEs e infectados com *L. braziliensis*. Macrófagos derivados da medula óssea foram estimuladas com VEs obtidas de células não infectadas ou de células infectadas. Após 48h de estimulação, as células foram infectadas com *L. braziliensis* (10:1) por 24h. Após coloração por H&E, os macrófagos foram visualizados por microscopia ótica. (A) Células infectadas. (B) Células estimuladas com VEs obtidas de macrófagos controle e posteriormente infectadas. (C) Células estimuladas com VEs obtidas de macrófagos infectados e posteriormente infectadas e (D) células estimuladas com VEs derivadas de macrófagos controle, sem infecção. As imagens foram observadas na objetiva 40x e as imagens em destaque foram observadas na objetiva de 100x.

Em paralelo à avaliação da infecção, também avaliamos a produção de citocinas nas culturas de células estimuladas com VEs e, posteriormente, infectadas com *L. braziliensis*. Assim, os macrófagos foram estimulados com 10^8 VEs/ml por 48h

e os sobrenadantes das culturas foram coletados após esta primeira estimulação. Os macrófagos foram então infectados com *L. braziliensis* por 24h e os sobrenadantes foram novamente coletados. A produção de citocinas foi então avaliada nestes sobrenadantes. A estimulação de macrófagos com 10^8 VEs/ml seguida de infecção com *L. braziliensis* reduziu a produção de TNF quando comparado às culturas que permaneceram sem infecção (Figura 15A). Este efeito foi observado tanto após a estimulação com VEs controle (obtidas de macrófagos não infectados) quanto após a estimulação com VEs obtidas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* (Figura 15A). Em todas as condições, a estimulação com VEs (independente da origem das VEs) reduziu a produção de TNF em macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Quanto à produção de IL-10, não observamos diferenças importantes quanto à produção de IL-10 nos macrófagos estimulados com VEs, tanto as obtidas de células controle quanto as obtidas de células infectadas com *L. braziliensis* (Figura 15B). Estes resultados indicam que a diminuição no número de amastigotas resultantes da pré-estimulação com 10^8 VE/ml não apresentam relação com a produção destas citocinas.

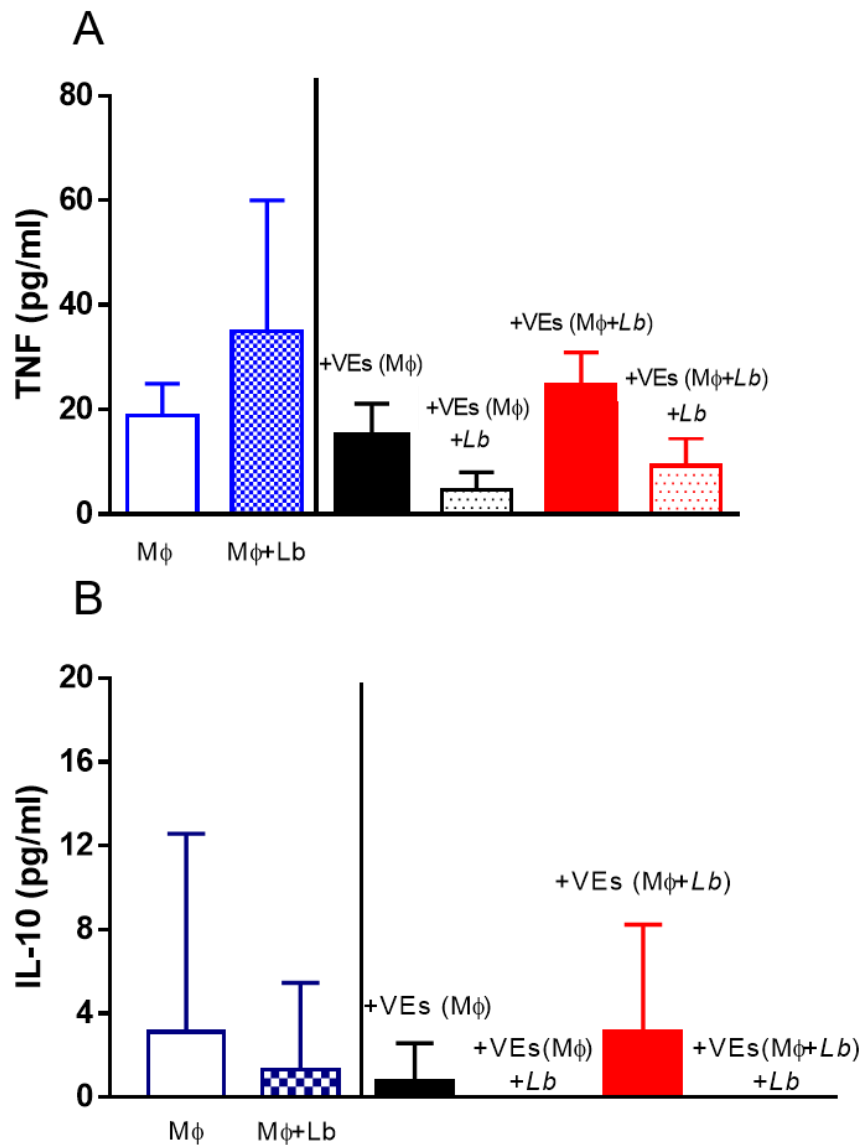


Figura 15. Produção de citocinas em macrófagos estimulados vesículas extracelulares e infectados com *L. braziliensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c foram pré-estimulados com 10^8 VE/ml derivadas de macrófagos controle (M Φ) ou derivadas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* (M Φ +Lb) por 48h. Em seguida, as células foram infectadas com *L. braziliensis* por 24h ou permaneceram em meio de cultura, sem parasitas. Como controle, macrófagos foram mantidos em cultura sem infecção (M Φ) ou foram infectados com *L. braziliensis* somente (M Φ +Lb). A produção de TNF (A) e IL-10 (B) foi avaliada nos sobrenadante de cultura por ELISA. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado em quintuplicata.

5.5 COMPOSIÇÃO PROTÉICA

Por fim, quantificamos o conteúdo proteico das VEs obtidas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Como mostrado na Figura 16, observamos maior concentração proteica nas VEs obtidas de macrófagos não infectados. Com 24h, a presença de *L. braziliensis* parece reduzir a carga proteica das VEs. Efeito inverso foi observado com 48h.

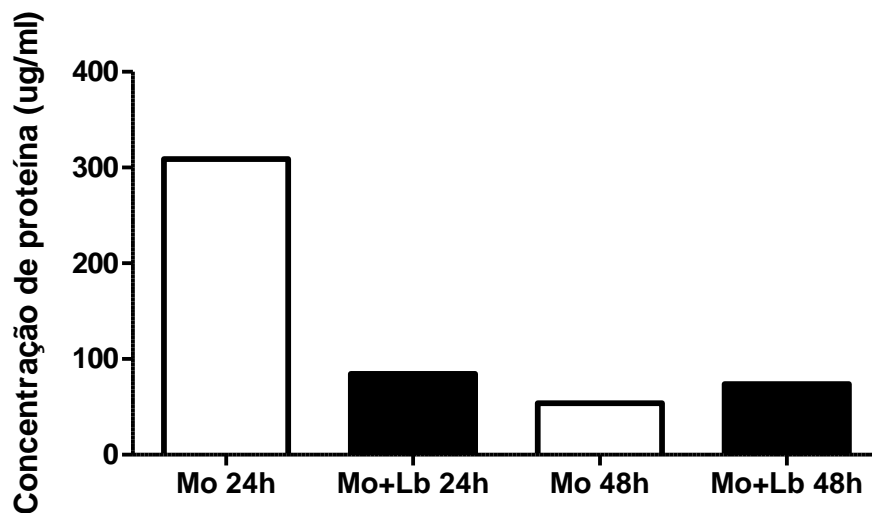


Figura 16. Concentração de proteína das VEs liberadas a partir de macrófagos infectados por *L. braziliensis*. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com *L. braziliensis* por 24h e 48h. As VEs foram isoladas por ultracentrifugação do sobrenadante de cultura e quantificadas por micro BCA.

6. DISCUSSÃO

Na última década, estudos sobre o papel das VEs na fisiopatologia de diferentes doenças vem crescendo exponencialmente, revelando a importância das nanovesículas na comunicação celular, na interação parasita-hospedeiro e na resposta imune do hospedeiro, por exemplo. Recentemente, foi demonstrado que promastigotas de *Leishmania* secretam exossomos no lúmen intestinal do vetor e estes são regurgitados juntamente com os parasitas na pele, durante o repasto sanguíneo, modulando a resposta imune do hospedeiro (ATAYDE et al., 2015). Além disso, VEs produzidas pela *Leishmania* na infecção, tanto *in vitro* quanto *in vivo* também interferem na resposta imune (SILVERMAN; REINER, 2012). Neste trabalho, avaliamos a produção de VEs por macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis* e avaliamos o resultado da estimulação de células com essas VEs, quanto à carga parasitária e à produção de citocinas.

No cultivo celular *in vitro*, uma importante fonte de fatores de crescimento, vitaminas e aminoácidos adicionais é o SFB, adicionado como suplemento. Contudo, o SFB também contém VEs as quais que podem interferir na caracterização das VEs da amostra de interesse (LEHRICH et al., 2018). Dessa forma, inicialmente realizamos ensaios de infecção de macrófagos com *L. braziliensis* utilizando primeiramente o SFB comumente utilizado e, posteriormente, um outro, depletado de VEs. Lehrich et al. (2018) observaram que a morfologia de astrócitos mudou no meio de cultura contendo SFB depletado de VEs, havendo diminuição do tamanho do corpo celular e presença de células flutuantes e mortas. A depleção de VEs do SFB por ultracentrifugação também alterou a diferenciação de mioblastos em células musculares esqueléticas (ASWAD; JALABERT; ROME, 2016). No entanto, em nossas mãos nós observamos que a utilização de um meio de cultura suplementado com o SFB depletado de VEs não alterou a taxa de infecção dos macrófagos murinos expostos à *L. braziliensis* e nem a quantidade de amastigotas detectadas no interior das células. Desta maneira, passamos a utilizar SFB depletado de VEs nos experimentos subsequentes.

Nossos experimentos de cinética de infecção de macrófagos com *L. braziliensis* mostraram que as maiores taxas de infecção foram nos tempos de 24h (56 %) e 48h (53 %). Similarmente, De Oliveira et al. (2017) infectaram macrófagos com *L.*

braziliensis na proporção 1:10 por 24h e 48h e observaram uma maior porcentagem de infecção (76,8%) no tempo de 24h, a qual diminuiu para 54,7% após 48h. Oliveira *et al.* (2019) também infectaram macrófagos com *L. braziliensis* por 24h e encontram aproximadamente 80% de células infectadas e uma média de 400 amastigotas por 100 células. Carvalho *et al.* (2019) infectaram células com *L. braziliensis* na proporção 1:5 por 2h e 48h e observaram, inicialmente cerca de 45% de taxa de infecção a qual aumentou para 60% em 48h. Diante desses resultados, escolhemos, para nossos ensaios subsequentes, os tempos de 24h e 48h para a obtenção de VEs produzidas por macrófagos infectados com *L. braziliensis*, pois as maiores taxas de infecção foram encontradas nesses dois tempos.

Uma vez determinados os tempos de infecção para a obtenção das VEs, diversos experimentos foram realizados a fim de produzir as mesmas em quantidade. Em seguida, as VEs produzidas foram separadas do sobrenadante das culturas por meio de centrifugação diferencial. A presença de VEs no *pellet* obtido a partir da centrifugação diferencial do sobrenadante de macrófagos infectados com *L. braziliensis* bem como das células controle foi confirmada por diversos parâmetros. Primeiramente, a microscopia eletrônica é necessária para caracterização morfológica, pois partículas menores que 300 nm são invisíveis nos microscópios ópticos (VAN DER POL *et al.*, 2010). Dessa forma, nossas micrografias obtidas por MEV e MET confirmaram a liberação de VEs por macrófagos infectados com *L. braziliensis* bem como a presença das mesmas em células controle. Nossos resultados também mostraram uma maior concentração de VEs secretada por macrófagos infectados com *L. braziliensis* por 24h quando comparado às células mantidas em cultura por 48h, na presença ou ausência de parasitas. A análise por NTA, além de confirmar a produção de VEs nos nossos experimentos com macrófagos infectados com *L. braziliensis* também mostrou que o diâmetro médio das VEs nestas células foi de 150,48 nm enquanto que nas células controle foi de 155,91 nm. Estes resultados estão de acordo aos estudos já publicados na literatura. Toledo *et al.* (2020), observaram uma maior produção de VEs em células B-1 infectadas com *L. amazonensis* quando comparado a células não infectadas, após análise por MEV e NTA também confirmaram. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* secretam VEs com diâmetro variando entre 50-300 nm e uma média de 5×10^7 VE. Tal quantidade é semelhante àquela encontrada em macrófagos não infectados (média = $5,2 \times 10^7$)

(CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014). Por outro lado, observou-se um maior número de VEs derivadas de células infectadas com *T. cruzi* do que células não infectadas, tais VEs demonstraram forma redonda com tamanho variando entre 50-200 nm (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020).

Os epimastigotas de *T. cruzi* também foram capazes de liberar VEs exibindo tamanho médio de 223,1 nm e quantidade média de $6,84 \times 10^7$ partículas/ml com base no NTA (PARANAIBA et al., 2019). *T. cruzi* da cepa YuYu (TCII) liberaram maior quantidade de VEs do que da cepa Y (TCI) e foi observado que tais VEs são enriquecidas com fatores de virulência *trans*-sialidase (RIBEIRO et al., 2018). Em *Leishmania*, as VEs também foram observadas nos promastigotas de *Leishmania*. Em condições de estresse, como aumento da temperatura de cultivo para 37 °C, foi possível observar aumento da liberação de VEs na cultura de promastigotas (ATAYDE et al., 2019; SILVERMAN et al., 2010a). Em *L. amazonensis*, micrografias confirmaram que a liberação de VEs, com aproximadamente 180 nm, ocorre em todo o corpo do promastigota (BARBOSA et al., 2018). Já os exossomos obtidos de promastigotas de *L. mexicana* apresentaram diâmetro variando de 40-100 nm (HASSANI et al., 2011), enquanto que, em *L. major* e *L. infantum*, as VEs exibiram diâmetro variando entre 50-120 nm, limitadas por membrana e em forma de taça ou arredondada (ATAYDE et al., 2015). Além disso, o tamanho das VEs depende da fase de vida do parasita, de forma que as VEs de *L. infantum* isoladas de amastigotas apresentaram tamanho médio de 122 nm e a forma promastigota teve VEs com diâmetro médio de 115 nm (CASTELLI et al., 2019), similar ao encontrado para amastigotas de *L. donovani* (120 nm) (LAMBERTZ et al., 2015).

Como comentado anteriormente, as VEs apresentam efeitos imunomoduladores. Na literatura é relatado que VEs e exoprodutos sem vesículas (ESV) derivados de promastigotas de *L. infantum* inibem a expansão de células T Natural Killer invariáveis (NKTi) do sangue periférico, sem afetar a frequência dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (BELO et al., 2017). Em outro estudo, observou-se que culturas de células (macrófagos e células dendríticas), realizadas na presença de quantidades crescentes de VEs ou ESV favorecem a infecção com *L. infantum*. Além disso, observou-se a menor expressão de CD40 e CD86 em células dendríticas quando estimuladas com exoprodutos ou ESV comparando com as células não

estimuladas, resultados semelhantes foram observados para os macrófagos com a diminuição da expressão de CD40 (PÉREZ-CABEZAS et al., 2019).

Atayde et al. (2019) descreveram que o vírus de RNA de *Leishmania* (LRV1) explora a via exossômica como um mecanismo de proteção viral e utiliza esta via para atingir o ambiente extracelular. Experimentos de co-infecção de camundongos com *L. mexicana* ou *L. panamensis* juntamente com exossomos contendo LRV1 mostraram que os animais apresentam maiores lesões quando comparado com os camundongos infectados apenas com *Leishmania* ou co-inoculados com as espécies de *Leishmania* e seus respectivos exossomos sem o vírus, além disso, a *L. mexicana* ou *L. panamensis* inoculados com o vírus livre não exacerbou as lesões. Dessa forma, o vírus envolto por VE aumenta a infectividade do parasita no hospedeiro mamífero (ATAYDE et al., 2019).

Células B-1 estimuladas por VEs obtidas de promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram aumento na expressão de IL-6 e diminuição da produção de IL-10, especialmente em células expostas a VEs obtidas a temperaturas de 37 °C. Os autores também observaram aumento na expressão de TNF- α nas células B-1 estimuladas com VEs derivadas de *L. amazonensis* enquanto que macrófagos estimulados com as VEs exibiram aumento da expressão de IL-10 e IL-6 (BARBOSA et al., 2018). Monócitos humanos estimulados com exossomos derivados de *L. donovani* e posteriormente infectados com *L. donovani* também apresentaram maior produção de IL-10 quando comparado com monócitos infectados mas não estimulados com VEs (SILVERMAN et al., 2010b). Esses resultados mostram que as VEs derivadas de *Leishmania* exercem efeitos imunomoduladores, sugerindo que estas VEs apresentam conteúdo capaz de induzir respostas nas células que sofrem estimulação. Fatores de virulência e outras biomoléculas presentes nas VEs podem modular a resposta da célula estimulada. A GP63 foi encontrada no exoproteoma de promastigotas de *L. infantum*, além disso o exoproteoma da fase logarítmica que se apresentou rico em proteínas ribossômicas enquanto que a forma estacionária apresenta VEs apoptóticas (SANTARÉM et al., 2013).

Nossos resultados indicam que a pré-estimulação de macrófagos murinos com VEs, sobretudo na concentração de 10^8 VE/ml, seguido da infecção dessas células

com *L. braziliensis* reduz significativamente a quantidade de amastigotas de células infectadas, independente da origem da VE obtida para estimulação celular. Esta redução da carga parasitária pode estar associada com o efeito quimiotático e o conteúdo das VEs. Em ensaios de migração, foi mostrado que exossomos de *L. infantum* induziram a migração celular, sugerindo que isto poderia induzir um maior controle da infecção (CASTELLI et al., 2019).

Diferente dos nossos resultados, diversos grupos relatam o papel das VEs na progressão de doenças parasitárias através de experimentos realizados em macrófagos e com camundongos. Macrófagos estimulados com exossomos derivados de células infectadas com *L. mexicana* regulam positivamente os fatores de transcrição pró-inflamatórios, evitando a ativação dos macrófagos e promovendo a infecção pelo parasita (HASSANI; OLIVIER, 2013). Similarmente, as VEs produzidas por macrófagos infectados por *L. amazonensis* também induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12p70, IL-1 β e TNF- α) (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014). O mesmo foi observado em *T. cruzi*, as VEs produzidas por macrófagos infectados atuam como agentes imunomoduladores, induzindo alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020). Na resposta imune do hospedeiro à *Leishmania* é fundamental que as células Th1 ativadas produzam citocinas IFN- γ , o qual induz a síntese de óxido nítrico (NO) promovendo a destruição do parasita (Revisado por SACKS; NOBEN-TRAUTH, (2002). Nossos resultados mostraram que após a estimulação com VEs derivadas de macrófagos infectados, as células estimuladas produzem IL-10 comparável ao controle e reduzem a produção de TNF.

Essa diferenciação expressão de citocinas observada nos nossos resultados pode ser explicada pelo conteúdo das VEs, que pode ser predominantemente derivado das células hospedeiras, como foi observado com células Vero infectadas com *T. cruzi* secretam VEs que apresentam conteúdo proteico predominantemente originário da própria célula Vero, com apenas 10% do conteúdo derivado do protozoário. Das proteínas identificadas de *T. cruzi*, houve predominância de proteínas da família trans-sialidase, que contribuem para virulência do parasita (BAUTISTA-LÓPEZ; NDAO; CAMARGO, 2017). A maioria das proteínas encontradas nas VEs derivadas de células controle e derivadas das células infectadas com *T. cruzi*

estão envolvidas com processos de comunicação celular, processos metabólicos e imunológicos, sendo que das 89 proteínas identificadas nas VEs de células infectadas, apenas 6 eram exclusivas do parasita (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020). Com relação a *Leishmania*, as proteínas encontradas em exossomos derivados de macrófagos controle (não infectados) é diferente de exossomos derivados de macrófagos infectados com *L. mexicana*. No entanto, ambos tipos de VEs induzem a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico após a estimulação de macrófagos com essas VEs (HASSANI; OLIVIER, 2013). As VEs derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* apresentam marcação positiva para Anexina V, sugerindo sua origem a partir de células apoptóticas (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014). Portanto, essa composição das VEs modula de maneira diferente a infecção.

Por fim, já existem trabalhos mostrando o efeito da estimulação com VEs, *in vivo*. Toledo *et al.* (2020) relataram que o pré-tratamento de camundongos com VEs derivadas de células B-1 infectadas ou não com *L. amazonensis* seguido da infecção desses animais *L. amazonensis* resultou em uma lesão menor e na redução da carga parasitária quando comparado com camundongo controle, tratados com PBS e infectados. Por outro lado, a exposição de camundongos C57BL/6 aos exossomos de *L. donovani* resultou em cargas parasitárias mais altas no baço após infecção subsequente com *L. donovani* além de maior produção de IL-10 e IFN- γ , semelhantemente, camundongos BALB/c expostos a exossomos de *L. major* e posteriormente infectados com *L. major* também apresentaram lesões maiores assim como elevada produção de IL-4, sugerindo que os exossomos criam um ambiente permissivo à infecção *in vivo* (SILVERMAN et al., 2010b). A inoculação de camundongos com altas doses de exoprodutos totais ou separados (VEs e exoproduto empobrecido em VE) estimularam o recrutamento de células, particularmente, neutrófilos eosinófilos e macrófagos (PÉREZ-CABEZAS et al., 2019).

7. CONCLUSÃO

Este estudo identificou e caracterizou as VEs produzidas por macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Observamos maior liberação de VEs em células infectadas comparado às não infectadas, contudo, apresentou menor tamanho de VE. Macrófagos estimulados com estas VEs, na concentração de 10^8 VEs/ml, apresentaram uma redução no número de amastigotas nas células. Os resultados preliminares permitem identificar um possível novo e potencial mecanismo de controle da Leishmaniose cutânea.

8. PERSPECTIVAS

Pretendemos, futuramente, realizar experimentos para avaliar a composição proteica das VEs a partir da detecção de TGS 101, Alix e CD63, marcadores específicos de VEs. Os fatores de virulência, como GP63, que auxiliam no estabelecimento da infecção de células hospedeiras pelo parasita também poderão ser analisados por *Western Blot*.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ASWAD, H.; JALABERT, A.; ROME, S. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016.

ATAYDE, V. D. *et al.* Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. **Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 957–67, 3 nov. 2015.

ATAYDE, V. D. *et al.* *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7–18, 2016.

ATAYDE, V. D. *et al.* Exploitation of the *Leishmania* exosomal pathway by *Leishmania* RNA virus 1. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 714–723, 2019.

BARBOSA, F. M. C. *et al.* Extracellular Vesicles Released by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3056, 2018.

BAUTISTA-LÓPEZ, N. L.; NDAO, M.; CAMARGO, V. crossm Characterization and Diagnostic Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 744–758, 2017.

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.

BELLINGHAM, S. A.; COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 21, p. 10937–10949, 2012.

BELO, R. *et al.* *Leishmania infantum* exoproducts inhibit human invariant NKT cell expansion and activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 710, 2017.

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.

BÖING, A. N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

BURGESS, R. R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. **Protein Expression and Purification**, v. 150, p. 81–85, 2018.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMPOS, J. H. *et al.* Extracellular vesicles: role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 14, 2015.

CARVALHO, A. M. *et al.* Glyburide, a NLRP3 inhibitor, decreases inflammatory response and is a candidate to reduce pathology in leishmania braziliensis infection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 1, p. 246–249, 2019.

CASTELLI, G. *et al.* Exosome secretion by *Leishmania infantum* modulate the chemotactic behavior and cytokinic expression creating an environment permissive for early infection. **Experimental Parasitology**, v. 198, n. February, p. 39–45, 2019.

CELES, F. S. *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

CHOI, D. S. *et al.* Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1554–1571, 2013.

CHRISTIANSON, H. C. *et al.* Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17380–17385, 2013.

CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196–203, 2013.

COAKLEY, G. *et al.* Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. **Cell Reports**, v. 19, n. 8, p. 1545–1557, 2017.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 364–372, 2015.

COLEMAN, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nature cell biology**, v. 3, n. 4, p. 339–345, 2001.

CRESCITELLI, R. *et al.* Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, 2013.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Extracellular vesicles from leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Trypanosoma cruzi-infected human macrophages shed proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–15, 2020.

DE OLIVEIRA, S. *et al.* Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy—ApPDT on infected macrophages. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 9, p. 1959–1964, 2017.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M. New advances in scanning microscopy and its application to study parasitic protozoa. **Experimental Parasitology**, v. 190, p. 10–33, 2018.

DONG, G.; FILHO, A. L.; OLIVIER, M. Modulation of host-pathogen communication by extracellular vesicles (EVs) of the protozoan parasite leishmania. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 100, 11 abr. 2019.

DRAGOVIC, R. A. *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 780–788, 2011.

FABBRI, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. E2110–E2116, 2012.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* Extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 285–304, 2014.

GEMMELL, C. H.; SEFTON, M. V.; YEO, E. L. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14586–14589, 1993.

GEORGE, N. *et al.* Membrane and Serum. **Blood**, v. 60, n. 4, p. 834–840, 1982.

HASSANI, K. *et al.* Temperature-induced protein secretion by leishmania mexicana modulates macrophage signalling and function. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

HASSANI, K.; OLIVIER, M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013.

IWAI, K. *et al.* Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, p. 30829, 2016.

JEPPESEN, D. K. *et al.* Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 25011, 2014.

JUNG, M. K.; MUN, J. Y. Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, n. 131, p. 5–9, 2018.

KALRA, H.; DRUMMEN, G. P. C.; MATHIVANAN, S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 170, 2016.

KASTELOWITZ, N.; YIN, H. Exosomes and microvesicles: Identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. **ChemBioChem**, v. 15, n. 7, p. 923–928, 2014.

KEERTHIKUMAR, S. *et al.* Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. **Oncotarget**, v. 6, n. 17, p. 15375–15396, 2015.

LAMBERTZ, U. *et al.* Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world Leishmania providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 151, 2015.

LEHRICH, B. M. *et al.* fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

LEITHERER, S. *et al.* Characterization of the protein tyrosine phosphatase LmPRL-1 secreted by Leishmania major via the exosome pathway. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 8, p. 1–19, 2017.

LUNAVAT, T. R. *et al.* Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells – Evidence of unique microRNA cargos. **RNA Biology**, v. 12, n. 8, p. 810–823, 2015.

MANTEL, P. *et al.* Malaria infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 5, p. 521–534, 2013.

MARSHALL, S. *et al.* Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010.

MCBRIDE, J. D.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; BADIAVAS, E. V. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutics in dermatology: a focus on exosomes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 8, p. 1622-1629, 2017.

MULCAHY, L. A.; PINK, R. C.; CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2014.

OLIVEIRA, F.; DE CARVALHO, A. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. NOV, p. 1–8, 2013.

OLIVEIRA, L. B. *et al.* The paradoxical leishmanicidal effects of superoxide dismutase (SOD)mimetic tempol in *leishmania braziliensis* infection in vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–7, 2019.

OSTEIKOETXEA, X. *et al.* Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

PARANAIBA, L. F. *et al.* Extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* affect early parasite migration in the gut of *rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 11, p. 1–5, 2019.

PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* More than just exosomes: distinct *Leishmania infantum* extracellular products potentiate the establishment of infection. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2019.

RIBEIRO, K. S. *et al.* Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1463779, 2018.

ROIG, J. *et al.* Extracellular vesicles from the helminth *Fasciola hepatica* Prevent DSS-induced acute ulcerative colitis in a T-lymphocyte independent mode. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–13, 2018.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SAMOIL, V. *et al.* Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

SANTARÉM, N. *et al.* Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 106–118, 2013.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SHELKE, G. V. *et al.* Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 24783, 2014.

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. 6, p. 842–852, 2010a.

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

SILVERMAN, J. M. AXWEL.; REINER, N. E. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2012.

SOKOLOVA, V. *et al.* Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 1, p. 146–150, 2011.

SOTILLO, J. *et al.* The protein and microRNA cargo of extracellular vesicles from parasitic helminths – current status and research priorities. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 9, p. 635–645, 2020.

THÉRY, C. *et al.* Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 30:3.22:3.22.1–3.22.29, 2006.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TOLEDO, M. DOS S. *et al.* Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental Leishmania (*Leishmania*) amazonensis infection. **Journal of Leukocyte Biology**, n. March, p. 1–12, 2020.

TORRECILHAS, A. C. *et al.* Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.

TWU, O. *et al.* *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 22–24, 2013.

VALADI, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.

VAN DER POL, E. *et al.* Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 12, p. 2596–2607, 2010.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2009.

WITWER, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p. 20360, 2013.

WU, Z. *et al.* Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3066, 15 jan. 2019.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 2015, p. 1–60, 2015.

YAO, C. Major surface protease of trypanosomatids: One size fits all? **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 22–31, 2010.

YOON, Y. J.; KIM, O. Y.; GHO, Y. S. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Reports**, v. 47, n. 10, p. 531–539, 2014.