



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

CANDACE MACHADO DE ANDRADE

**ESTUDO DO EFEITO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
DERIVADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR
Leishmania amazonensis SOBRE A INFECÇÃO
LEISHMANIÓTICA**

Salvador, BA
2016

CANDACE MACHADO DE ANDRADE

**ESTUDO DO EFEITO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
DERIVADAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR
Leishmania amazonensis SOBRE A INFECÇÃO
LEISHMANIÓTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Virgínia Maria Góes da Silva

Salvador, BA
2016

Para o gigante Lain.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus pelo sustento nessa etapa da minha vida. Sem Ele não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador, Dr. Lain, pela disponibilidade, confiança e compreensão durante esses dois anos de mestrado. Você sempre será um exemplo de ser humano e profissional.

A minha co-orientadora, Dr^a Virgínia, pelos anos de convivência, paciência e compreensão. Obrigada por ter sido tão importante na minha formação.

A meus pais por terem me apoiado incondicionalmente, graças a vocês consegui alcançar mais um objetivo de vida. Agradeço aos meus irmãos, pelo afeto e por me trazerem as melhores risadas.

A minha família por todo incentivo e por toda a torcida, em especial ao meu tio Moacy e tia Ana por terem me recebido sempre de braços abertos e terem sido meu ponto de apoio aqui nessa cidade.

A minha grande amiga Catiule, por ter sido tão companheira nos momentos felizes e me consolado nos momentos de tristeza.

A Cintia, por ter me acolhido no laboratório e me ensinado muito do que sei hoje. Obrigada pela amizade e infinita paciência que você teve comigo ao longo do tempo.

A Emanuelle por sempre ter sido tão legal comigo, pelo companheirismo e pela amizade construída. Você garantiu minhas melhores risadas no laboratório dele.

A Jéssica pela ótima convivência durante esse tempo. Obrigada pela amizade e por ser companheira de casa.

A Luciana e Viviane pelos conselhos, pelo colo sempre disponível e por terem contribuído para a elaboração desse trabalho.

A André por estar sempre disposto a tirar minhas dúvidas.

Aos amigos Afrânio, Caroline, Igor, Jaqueline, Marcus, Maíra, Regina e Tayane pela convivência feliz e discussões científicas.

Aos colegas do LPBI, em particular Beatriz Dias por todo o auxílio nos experimentos *in vitro*.

A Dr^a. Adriana Lanfredi e Dr. Cláudio pelo auxílio na microscopia de fluorescência.

Aos amigos e colegas do PPGIm, especialmente Aínda, Amanda, Cayo e Mariele.

Aos amigos que mantenho desde a época da escola e da faculdade.

Por fim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

"Everything that we see is a shadow cast by that which we do not see."
Martin Luther King Jr.

RESUMO

As leishmanioses se constituem um complexo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* spp. Esses parasitos infectam preferencialmente os macrófagos, podendo infectar também células dendríticas e neutrófilos. Macrófagos infectados por microrganismos intracelulares produzem vesículas extracelulares (VEs), que podem modular respostas imunes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essas VEs são consideradas uma das principais vias de comunicação intercelulares, em conjunto com fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, lipídios, óxido nítrico e moléculas de adesão. Foi demonstrado pelo nosso grupo que vesículas extracelulares secretadas por macrófagos infectados por *L. amazonensis* são capazes de estimular a produção de IL-12, IL-1 β e TNF- α por macrófagos *naive*. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dessas vesículas sobre a infecção leishmaniótica tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para isso, as vesículas extracelulares foram geradas a partir de macrófagos originados de medula óssea de camundongos BALB/c superinfectados com *L. amazonensis*, a confirmação da produção dessas vesículas foi obtida pela visualização das mesmas pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês). As vesículas não foram capazes de interferir na infecção por *L. amazonensis in vitro*, não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de macrófagos infectados e nem no número de parasitos por célula. Em modelo murino, a utilização dessas vesículas ocasionou aumento significativo da carga parasitária em relação ao grupo controle salina sem interferir no tamanho de lesão e na produção de anticorpos anti-*Leishmania*. É possível que essas vesículas exerçam importante papel no processo biológico da doença, sendo responsáveis pelo agravamento da infecção.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, *Leishmania*, macrófagos.

ABSTRACT

Leishmaniases are a complex of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* spp. These parasites preferentially infect macrophages, which can also infect dendritic cells and neutrophils. Macrophages infected by intracellular microorganisms release extracellular vesicles (EVs), which can modulate immune responses in vitro and in vivo. These EVs have an important part to play in intercellular communication, together with growth factors, cytokines, nucleotides, lipids, nitric oxide and adhesion molecules. Our group showed that extracellular vesicles secreted by macrophages infected with *L. amazonensis* are able to induce the production of IL-12, IL-1 β and TNF- α by macrophages naive. The aim of this study was to evaluate the role of these vesicles on *Leishmania amazonensis* infection both in vitro and in vivo. For this, the extracellular vesicles were generated from macrophages derived from bone marrow of BALB/c superinfected with *L. amazonensis*, confirmation of production of vesicles was obtained by nanoparticle tracking analysis. The vesicles were not able to interfere with infection by *L. amazonensis* in vitro, there was no statistically significant difference in the percentage of infected macrophages and in the number of parasites per cell. In a murine model, the vesicles caused a significant increase in parasite burden compared to the saline control group without interfering with the lesion size and production of anti-*Leishmania* antibodies. It is possible that these vesicles carry important role in the biological process of the disease, being responsible for the worsening the infection.

Keywords: Extracellular vesicles, *Leishmania*, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Formação de vesículas extracelulares.	23
Figura 2 "Frame" do vídeo gravado para as análises das vesículas.	33
Figura 3 Distribuição do tamanho das vesículas em função da concentração.	34
Figura 4 Percentual de macrófagos infectados.	35
Figura 5 Carga parasitária nos macrófagos infectados.	35
Figura 6 Efeito da imunização com vesículas extracelulares sobre o desenvolvimento de leishmaniose experimental.	36
Figura 7 Semiquantificação de IgG, IgG1 e IgG2a.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

Adora2a	Receptor 2a de adenosina
CD	Grupamento de diferenciação
CO ₂	Dióxido de carbono
CR	Receptor do complemento
DMEM	Dulbecco's modified Eagle médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GMCSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LCM	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenosina
NK	<i>Natural Killer</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
TGF	Fator de transformação do crescimento

Th1	Resposta de célula T auxiliar do tipo 1
Th2	Resposta de célula T auxiliar do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
VE	Vesículas extracelulares derivadas de macrófagos não infectados
VELa	Vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos gerais das leishmanioses	16
2.2 Resposta imune na leishmaniose	17
2.3 Interação macrófago – <i>Leishmania</i>	21
2.4 Vesículas extracelulares	22
2.5 Vesículas de <i>Leishmania</i>	24
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	26
3.1 Hipótese	26
3.2 Objetivo geral.....	26
3.2.1 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Animais experimentais.....	27
4.2 Cultivo dos parasitos.....	27
4.3 Geração e caracterização de vesículas	27
4.3.1 Obtenção e diferenciação de células de medula óssea em macrófagos	27
4.3.2 Infecção dos macrófagos	28
4.3.3 Produção de vesículas de membrana a partir de macrófagos.....	28
4.3.4 Caracterização das vesículas	29
4.3.5 Dosagem de proteínas.....	29
4.4 Avaliação do efeito de VEs derivadas de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e não infectados na infecção <i>in vitro</i>	29
4.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	29
4.4.2 Separação de promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i>	30
4.4.3 Tratamento dos macrófagos residentes com vesículas de membrana e infecção.....	30
4.5 Avaliação do efeito imunomodulador de VEs derivadas de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e não infectados em modelo experimental murino	31

4.5.1	Imunizações.....	31
4.5.2	Infecção e acompanhamento da lesão.....	31
4.5.3	Quantificação da carga parasitária.....	31
4.5.4	Dosagem de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti- <i>Leishmania</i>	32
5.	RESULTADOS	33
5.1	Caracterização das vesículas	33
5.2	Avaliação do efeito de VEs derivadas de macrófagos infectados ou não por <i>L. amazonensis in vitro</i>	34
5.3	Avaliação do efeito das vesículas em modelo de leishmaniose tegumentar murino.....	36
6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÃO	42
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são doenças causadas por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* (HANDMAN, 2001), que apresentam altos índices de morbidade e mortalidade em 98 países (AÏT-OU DHIA *et al.*, 2011). Os parasitos do gênero *Leishmania* estão bem adaptados ao ambiente dentro do hospedeiro mamífero e dos insetos vetores, persistindo nos tecidos e replicando-se, subvertendo a resposta imune do hospedeiro vertebrado, e se disseminando para outros hospedeiros (revisto por SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; revisto por DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Os macrófagos desempenham papel crucial para a resposta imune e sua ausência permitiria o progresso incontrollável de infecções, provocando a morte do hospedeiro (revisto por DUQUE & DESCOTEAUX, 2015). A interação entre os macrófagos e a *Leishmania* envolve inúmeros fatores de virulência que permitem que os parasitos sobrevivam no ambiente hostil do fagolisossomo (SILVEIRA *et al.*, 2009; revisto por DUQUE & DESCOTEAUX, 2015).

Macrófagos ativados, em apoptose ou infectados por algumas bactérias como *Mycobacterium avium* (BHATNAGAR & SCHOREY, 2007), *Mycobacterium tuberculosis* (BHATNAGAR *et al.*, 2007; GIRI *et al.*, 2010), *Mycobacterium bovis* (BHATNAGAR *et al.*, 2007; GIRI & SCHOREY, 2008) e *Salmonella typhimurium* (BHATNAGAR *et al.*, 2007), produzem vesículas extracelulares. Geralmente essas vesículas possuem atividade pró-inflamatória, sendo capazes de ativar macrófagos *naive*, células TCD8⁺ e TCD4⁺ e induzir a maturação de células dendríticas (O'NEILL & QUAH, 2008; SCHOREY & BHATNAGAR, 2008). O uso potencial dessas vesículas como componentes de novas vacinas está sendo estudado em virtude de suas atividades imunoestimuladoras (CHAPUT *et al.*, 2004). Em contraste com o descrito para os patógenos bacterianos, não existe um consenso na literatura sobre os efeitos e propriedades das vesículas secretadas por macrófagos infectados com parasitos do gênero *Leishmania* (HASSANI & OLIVIER, 2013).

Em estudos preliminares realizados pelo nosso grupo, foi observado que vesículas extracelulares secretadas por macrófagos infectados por *L. amazonensis* são capazes de estimular a produção de IL-12, IL-1 β e TNF- α por macrófagos *naive* (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014). A produção dessas citocinas está

relacionada com a resistência a infecção por *Leishmania* (revisto por **ALEXANDER & BROMBACHER, 2012**).

Desta maneira, é relevante avaliar se essas vesículas oriundas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* são capazes de proteger contra a infecção leishmaniótica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de infecções causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (CHAPPUIS *et al.*, 2007). O parasito possui um ciclo de vida digenético e é transmitido aos humanos durante o repasto sanguíneo dos flebótomos (Diptera: Psychodidae) infectados (LAINSON, 1983). Estima-se que existam cerca de 2 milhões de novos casos das leishmanioses por ano no mundo (WHO, 2014), sendo consideradas doenças endêmicas em 98 países, incluindo alguns da América do Sul (GRIMALDI & TESH, 1993; WHO, 2014). Entretanto, a doença não é diagnosticada na Austrália, Antártica e nas ilhas do Pacífico (KEVRIC *et al.*, 2015). A leishmaniose é a segunda principal causa de mortes por doenças parasitárias (depois da malária), causando entre 20000 a 30000 mortes anuais (WHO, 2014).

São descritas quatro manifestações clínicas da doença: leishmaniose cutânea (LC), cutânea-difusa (LCD), mucocutânea (LCM) e visceral (LV). A apresentação clínica vai depender da resposta imune celular do hospedeiro, idade, estado nutricional, da espécie infectante, do flebótomo, do sítio de inoculação e dose (KEVRIC *et al.*, 2015). Enquanto as formas cutâneas da doença tendem para cura espontânea, a doença visceral é fatal quando não tratada (WHO, 2014).

Entre 2003 e 2007, o Brasil apresentou a maior incidência das leishmanioses cutânea e visceral das Américas (ALVAR *et al.*, 2012). No país, as principais espécies do protozoário responsáveis pela forma cutânea são *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (GRIMALDI *et al.*, 1989; COSTA, 2005).

De modo geral, na leishmaniose cutânea em humanos é comum o aparecimento de úlceras com bordo elevado e fundo necrótico. Inicialmente há o comprometimento da pele e a linfadenopatia regional pode anteceder o aparecimento das lesões cutâneas (BARRAL *et al.*, 1995). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) pode ser causada tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis*, mas o desenvolvimento da leishmaniose cutânea difusa no Brasil é atribuído apenas à *L. amazonensis* (GRIMALDI & TESH, 1993; CARVALHO *et al.*, 1995; SILVEIRA *et al.*, 2009). A LCL é caracterizada por lesão única ou múltiplas no local da picada do flebótomo (revisto por REITHINGER *et al.*, 2007). A LCD é caracterizada pelo elevado número de parasitos na lesão e pela falta de resposta imune celular anti-*Leishmania* (SILVEIRA *et al.*, 2009). O baixo número de parasitos

por lesão associado com intensa resposta celular caracteriza a LCM (**CARVALHO et al., 1985; BARRAL et al., 1995**).

Os tratamentos disponíveis para as leishmanioses estão longe do ideal. São fármacos de alto custo, com elevada toxicidade e em áreas endêmicas já se observa resistência às drogas (**KEVRIC et al., 2015**). Os antimoniais pentavalentes permanecem como drogas de primeira escolha (**KEVRIC et al., 2015**). Entretanto, causam muitos efeitos colaterais, como dores epigástricas, mialgias, arritmias, reações de hipersensibilidade, leucopenia, trombocitopenia e anorexia (**DAVIDSON, 1998**). Em regiões endêmicas já se observa resistência a esses fármacos (**AYRES et al., 2007**).

Os casos que não respondem aos antimoniais são tratados com anfotericina B ou com pentamidina, drogas de uso ainda limitado pelo seu alto custo e elevada toxicidade. Os principais efeitos colaterais decorrentes do uso da anfotericina são: reações de hipersensibilidade, hipopotassemia, nefrotoxicidade, anemia e febre (**BARRAL-NETTO et al., 1995; KEVRIC et al., 2015**). A pentamidina pode causar abscessos nos locais da lesão, cefaleia, náusea e hipotensão como efeitos colaterais (**KEVRIC et al., 2015**). Entretanto, estes tratamentos estão sendo substituídos por fármacos menos tóxicos como a miltefosina, paramomicina e anfotericina B lipossomal (**KEVRIC et al., 2015**).

2.2 Resposta imune na leishmaniose

Após a inoculação na derme do hospedeiro, as leishmânias precisam evadir dos mecanismos de proteção do sistema imune para que possam se multiplicar e se disseminar (revisito por **LIU & UZONNA, 2012**). Nos eventos iniciais após a infecção, o parasito sobrevive aos mecanismos da defesa inata, como o sistema complemento e células como os macrófagos, neutrófilos, célula matadoras naturais [células *Natural Killer* (NK), do inglês] e células dendríticas (**de SOUZA, 2002**). Em seguida, a leishmânia enfrenta os mecanismos específicos da resposta imune adaptativa. Mesmo assim, o parasito possui um arsenal de estratégias de evasão que são capazes de subverter a resposta imune para garantir o sucesso da infecção (**SHIO et al., 2012**).

A resposta imune inata é capaz de reconhecer antígenos que expressam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (**STAFFORD et al., 2002**). Essas moléculas são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões

(PRRs, do inglês) que estão presentes nas células da imunidade inata (revisado por **GURUNG & KANNEGANTI, 2015**). Essas células são responsáveis por limitar a disseminação do parasito e modular as reações posteriores do sistema imune (**STAFFORD et al., 2002**). Os macrófagos são as principais células hospedeiras durante a infecção leishmaniótica, sendo assim, são responsáveis pela eliminação do parasito (**HEYNEMAN, 1971**).

Para que possam cumprir o seu papel, os macrófagos precisam ser ativados pela ligação dos PRRs aos PAMPs e por algumas citocinas, desta maneira haverá transdução de sinais intracelulares culminando na ativação do macrófago, na produção de metabólitos tóxicos como as espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e na indução da expressão de moléculas de adesão (**ASSREUY et al., 1994**).

Os neutrófilos são atraídos para o sítio de infecção pelas moléculas de adesão liberadas pela ativação dos macrófagos residentes (**PETERS et al., 2008**). Essas células estão relacionadas com a destruição dos parasitos por meio de enzimas proteolíticas e pela produção de espécies reativas de oxigênio (**LIMA et al., 1998; GUEIRARD et al., 2008**). Por outro lado, essas células podem ser usadas pelo parasito como “cavalo de Tróia” para adentrar silenciosamente nos macrófagos sem ativar os seus mecanismos microbicidas (**van ZANDBERGEN et al., 2004**).

As células NK, componentes celulares adicionais da resposta imune inata (revisado por **SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002**), contribuem para uma resposta imune protetora em modelo murino de leishmaniose tegumentar (revisado por **BOGDAN, 2012**). Existem relatos de que as células NK são capazes de lisar células infectadas por *L. major* (**WRIGHT et al., 1983**). Já foi demonstrado que a depleção de células NK promove o aumento da carga parasitária tecidual em camundongos infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* (**LAURENTI et al., 1999**; revisado por **BOGDAN, 2012**).

Além dos macrófagos, neutrófilos e células NK, as células dendríticas são células efetoras da imunidade inata (revisado por **LIU & UZONNA, 2012**). Essas células estão envolvidas na captura, transporte e apresentação de antígenos (**BANCHEREAU & STEINMAN, 1998**; revisado por **LIU & UZONNA, 2012**). Após ativação, essas células transportam os antígenos de *Leishmania* para o linfonodo drenante, onde vão ativar os linfócitos T *naive* e iniciar a uma resposta imune adaptativa (**MOLL et al., 1993**).

No modelo murino de infecção por *L. major* é bem estabelecido que o desenvolvimento de uma resposta adaptativa promovida por células TCD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1, do inglês) está associado à proteção contra a infecção e que o desenvolvimento de uma resposta Th2 está relacionado com falha no controle da doença (**MOCCI & COFFMAN, 1995**; revisto por **SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002**). Nesses animais, a expressão de subclasses de IgG é influenciada por múltiplos fatores, incluindo o padrão de produção de citocinas no ambiente inflamatório (**ROSTAMIAN et al., 2015**). Recentemente tem se discutido a influência das células T auxiliares foliculares (Tfh, do inglês) na troca de isotipo de anticorpos da classe IgG em modelo animal (revisto por **ALEXANDER & BROMBACHER, 2012**). Em camundongos a produção da IL-4 por esse tipo celular implica na troca de subclasse para IgG1, enquanto a produção de IgG2a não depende da IL-4 e sim da ligação do interferon gama (IFN- γ) às células B no centro germinativo (**REINHARDT et al., 2009**). Sendo assim, esses dois isotipos são usados como marcadores de resposta Th1 e Th2 contra *Leishmania* (**WANG et al., 1994**). Entretanto, não se observa claramente essa dicotomia na infecção humana (**CASTELLANO et al., 2009**) e o controle da leishmaniose cutânea requer o desenvolvimento de uma resposta imune balanceada (**LAKHAL-NAOUAR et al., 2015**).

A atuação da IL-12, citocina produzida por macrófagos e células dendríticas, promove a diferenciação e expansão de resposta imune de natureza Th1 (**SYPEK et al., 1993**). Como consequência, há produção de INF- γ pelas células Th1 e pelas células NK, fator importante para a eliminação do parasito visto que essa citocina ativa as funções leishmanicidas do macrófago. Além disso, ativa a enzima óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) com consequente produção de óxido nítrico e outros radicais livres que são necessárias para a eliminação do parasito intracelular (**STENGER et al., 1994; WANG et al., 1994; LIU & UZONA, 2012**).

Por outro lado, a suscetibilidade em modelo murino de infecção por *L. major* está relacionada ao desenvolvimento de resposta imune do tipo Th2 ou à incapacidade de gerar resposta Th1. Nesse contexto, há síntese de citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 e do fator transformador do crescimento – beta (TGF- β), que podem suprimir as células NK e também as funções microbicidas dos macrófagos (**SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002**). Esse ambiente polarizado em resposta linfocítica Th2 leva ao aumento da atividade da arginase e a produção de poliaminas que favorecem a multiplicação dos parasitos no interior dessas células causando a

progressão da doença (REINER & LOCKSLEY, 1995; HONDOWICZ & SCOTT, 2002; LIU & UZONA, 2012).

Mesmo com o desenvolvimento de resposta Th1, o parasito permanece em pequenos números, não sendo totalmente eliminado (CARVALHO *et al.*, 1985). Isso ocorre na LCM, em que a resposta Th1 encontra-se exacerbada (CARVALHO *et al.*, 1985). Pacientes com esta forma de leishmaniose cutânea possuem forte resposta de células T contra antígenos do parasito, linfoproliferação elevada além de alta produção de IFN- γ e TNF- α *in vitro* (PIRMEZ *et al.*, 1990). Por outro lado, a diminuição ou ausência de resposta Th1 e presença de citocinas regulatórias como IL-10, observadas em indivíduos com LCD, favorece a multiplicação e disseminação do parasito (CASTELLANO *et al.*, 2009). A infecção assintomática por *L. braziliensis* é observada em indivíduos capazes de apresentar resposta imune balanceada, que não só controla o parasitismo como também previne o dano tecidual (BACELLAR *et al.*, 2002).

A tradicional dicotomia dos papéis das células Th1 e Th2 tem sido alvo de discussão à medida que novos conhecimentos vão sendo adquiridos (revisado por ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). O papel das células Th17 na leishmaniose, por exemplo, permanece indefinido e já foi relacionado tanto à promoção da doença quanto à proteção (revisado por ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). Já foi descrito que a IL-17 está relacionada com a proteção durante a leishmaniose visceral humana e que pacientes resistentes apresentam níveis aumentados de IL-17 circulante (PITTA *et al.*, 2009). Entretanto, um estudo recente demonstrou em modelo murino de leishmaniose visceral que camundongos deficientes em IL-17 são resistentes à infecção por *L. donovani* em comparação com camundongos selvagens (TERRAZAS *et al.*, 2015).

Os estudos sobre a função das células Th9 na leishmaniose são escassos. As informações descritas na literatura envolvem apenas a infecção em camundongos por *L. major* (revisado por ALEXANDER & BROMBACHER, 2012). O bloqueio da IL-9 em camundongos BALB/c infectados por *L. major* reduz a resposta Th2 e promovendo resposta Th1, estimulando assim as funções microbidas do macrófago (ARENDSE *et al.*, 2005).

2.3 Interação macrófago – *Leishmania*

Após a inoculação das leishmânias na derme, os macrófagos são recrutados para o sítio da infecção e sua interação com os parasitos exerce influência sobre o curso da infecção (**RIBEIRO GOMES *et al.*, 2007**). A interação da *Leishmania* com o macrófago envolve diversos fatores de patogenicidade que permitem a obtenção de nutrientes pelo parasito, alteração de vias antimicrobianas e replicação (revisito por **DUQUE & DESCOTEAUX, 2015**). Muitas moléculas de superfície do macrófago hospedeiro e de *Leishmania* estão envolvidas no processo de internalização do parasito (**LIU & UZONNA, 2012**).

O lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa (GP63), principais componentes da superfície das formas promastigotas, são importantes para a iniciação do processo de fagocitose e para a sobrevivência do protozoário na célula hospedeira (**YAO *et al.*, 2003; NADERER & MCCONVILLE, 2008**). A GP63 é uma metaloproteinase que é capaz de clivar proteínas do hospedeiro, interferindo assim em processos de transcrição e tradução da célula, bem como nas vias de sinalização que poderiam matar o parasito no fagolisossomo e impedir sua disseminação (**OLIVIER *et al.*, 2012; SHIO *et al.*, 2012**). O LPG inibe a maturação do fagossomo no estágio inicial da infecção (**DESJARDINS & DESCOUTEAUX, 1997**) e também inibe a formação do complexo de ataque a membrana (**PUNTES *et al.*, 1990**).

Muitas espécies de *Leishmania* possuem em sua superfície celular receptores para macrófagos, incluindo receptores de complemento (CRs), receptores de manose (**CHANNON *et al.*, 1984**), receptores de fibronectina (**RIZVI *et al.*, 1988**) e receptores Fcγ (**CHANG, 1981; UENO & WILSON, 2012**).

O receptor envolvido na internalização do parasito influencia no curso da infecção, por exemplo, a internalização mediada pelos receptores do complemento (CR3 e CR1) inibe a inflamação e a produção de superóxido. Isso cria um ambiente favorável para o parasito no fagolisossomo. A sinalização via receptores de manose estimula a via inflamatória e a entrega de enzimas hidrolíticas no fagolisossomo. A fagocitose mediada por receptores Fcγ leva a ativação do complexo enzimático NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidase no fagolisossomo (**UENO & WILSON, 2012**).

Uma vez dentro do fagolisossomo, os promastigotas se transformam em formas ovais amastigotas e estas se multiplicam por fissão binária. Quando a célula

fica superlotada de parasitos pode se romper e liberar os amastigotas que infectam outras células disseminando a infecção (**HANDMAN & SPIRA, 1977**) ou pode se tornar apoptótica transferindo os parasitos para os macrófagos vizinhos (**REAL et al., 2014**).

Os macrófagos infectados por *Leishmania* podem ter alteradas suas funções microbidas, o seu perfil de produção de citocinas e a capacidade de apresentação de antígenos (revisto por **LIU & UZONNA, 2012**). Além disso, uma vez infectadas, essas células são capazes de produzir vesículas extracelulares que induzem resposta inflamatória (**CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014**). A ativação apropriada do macrófago (de forma que não interfira em suas funções) é fundamental para a eliminação do patógeno.

2.4 Vesículas extracelulares

A comunicação celular pode acontecer via mediadores solúveis ou pelo contato célula-célula. Recentemente tem sido descrito na literatura a comunicação através das vesículas extracelulares (**KOOJIMANS et al., 2012**). A secreção de vesículas ocorre em quase todos os tipos celulares tanto de forma fisiológica quanto por ativação celular ou apoptose (**ZWAAL & SCHROIT, 1997; O'NEILL & QUAH, 2008; KOOJIMANS et al., 2012**). Elas mantêm o fenótipo da célula que as originaram, podendo expressar moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, moléculas de superfície de membrana e transportar antígenos (**THÉRY et al., 2009; JOHANSSON et al., 2008**), o que explica o tropismo dessas vesículas semelhante ao da célula que as originou (**WIKLANDER et al., 2015**). A presença de integrinas, grupamento de diferenciação (CD, do inglês) 11b, CD18, entre outros receptores e moléculas de adesão permitem a interação dessas vesículas com as células (**THÉRY et al., 2009**).

Desta maneira as vesículas interagem facilmente com as células-alvo e induzem resposta inflamatória tanto *in vivo* quanto *in vitro* e por isso estão sendo estudadas para a possível composição de futuras vacinas (**KOOJIMANS et al., 2012**).

Foram identificadas três principais populações de vesículas extracelulares (Figura 1), que são classificadas de acordo com sua origem intracelular (**KOOJIMANS et al., 2012**). Diferentes técnicas são empregadas na caracterização das vesículas, entre elas estão: citometria de fluxo, Western blotting, técnica de

rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês), espectrometria de massas e microscopia eletrônica (VAN DER POL, *et al.*, 2014).

As micropartículas são originadas por fissão e brotamento da membrana plasmática para o meio extracelular (Figura 1a) e possuem de 50-1000 nm de tamanho (RATAJCZAK *et al.*, 2006). A secreção dessas microvesículas é dependente de energia, acontece em condições basais e aumenta sob estimulação (stress oxidativo, hipóxia, entre outros estímulos) (ZWAAL & SCHROIT, 1997; RATAJCZAK *et al.*, 2006).

Os corpos apoptóticos são formados tanto pela ativação celular quanto nas fases iniciais da apoptose para evitar o extravasamento do conteúdo tóxico intracelular para a matriz extracelular (Figura 1b) (DOONAN & COTTER, 2008; BEYER & PISETSKY, 2009). Esses corpos são um grupo heterogêneo de vesículas com tamanho variável (1 a 5 μm), que possuem uma variedade de conteúdo celular incluindo DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico), histonas e fosfatidilserina (BEYER & PISETSKY, 2009).

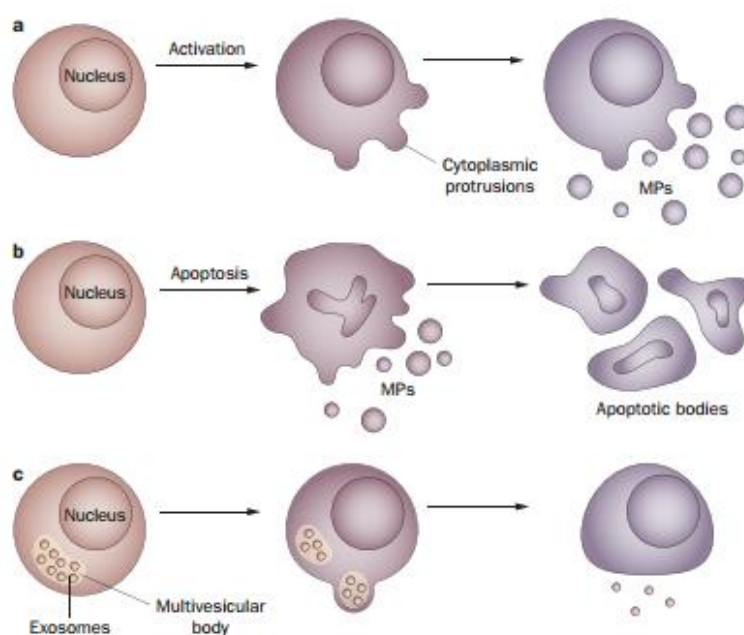


Figura 1. Formação de vesículas extracelulares. A. Formação das micropartículas. **B.** Formação dos corpos apoptóticos. **C.** Formação dos exossomos. **Fonte:** BEYER & PISETSKY, 2010.

Os exossomos possuem normalmente 40-100 nm (SIMONS & RAPOSO, 2009). São formados em corpos multivesiculares no citosol que se fundem com a

membrana plasmática e passam para o meio extracelular (Figura 1c) (**RECORD et al., 2011**). Os exossomos são secretados por células dendríticas (**THERY et al., 2009**), macrófagos (**BHATNAGAR et al., 2007**), células B (**CLAYTON et al., 2005**), células T (**NOLTE-'T HOEN et al., 2009**) e células tumorais (**BENITO-MARTIN et al., 2015**), entre outras.

2.5 Vesículas de *Leishmania*

Estudos realizados com *Leishmania* têm demonstrado que o parasito é capaz de liberar exossomos com atividades imunomodulatórias e indutoras de sinalização (**ATAYDE et al., 2015**). Estudos proteômicos dessas vesículas indicam a presença de fatores de virulência no conteúdo dessas vesículas, como GP63 e também a presença de pequenas sequências de RNA com potencial regulatório (**HASSANI et al., 2011; HASSANI et al., 2014; ATAYDE et al., 2015, LAMBERTZ et al., 2015**). Sendo assim, é possível que os exossomos representem veículos que permitem a entrada de fatores de virulência no citoplasma hospedeiro (**KAYE & SCOTT, 2011**).

Atayde e colaboradores (2015) demonstraram, pela primeira vez, que as vesículas liberadas por *Leishmania* no lúmen do intestino do flebótomo são entregues juntamente com as promastigotas durante a picada. Além disso, eles observaram também que essas vesículas são capazes de exacerbar a infecção *in vivo*.

Já foi demonstrado que os exossomos de *L. major* e de *L. donovani* são capazes de influenciar no desfecho da doença, exacerbando a infecção, quando administrados antes da infecção experimental (**SILVERMAN et al., 2010**).

Hassani e colaboradores (2014) demonstraram que a injeção de exossomos de *L. major* em camundongos BALB/c induz o recrutamento de células inflamatórias, neutrófilos em sua maioria, no local da inoculação. Essas células poderiam se tornar infectadas e contribuir na disseminação da infecção (**HASSANI et al., 2014**). Também já foi descrito na literatura que o parasito é capaz de liberar exossomos no compartimento citosólico de macrófagos infectados (**SILVERMAN et al., 2010**). Nesse sentido, foi mostrado que vesículas extracelulares produzidas por macrófagos infectados por *L. mexicana* são capazes de induzir a sinalização e modular a expressão de genes imunorregulatórios em macrófagos *naive* (**HASSANI & OLIVIER, 2013**). Além disso, já foi observado que vesículas liberadas por macrófagos infectados por *L. amazonensis* são capazes de estimular a produção de

citocinas pró-inflamatórias por macrófagos *naive* (**CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014**). Entretanto a função dos exossomos na patogênese permanece indeterminado.

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Vesículas extracelulares derivadas de macrófagos superinfectados com *Leishmania amazonensis* são capazes de proteger contra a infecção leishmaniótica tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

3.2 Objetivo geral

Estudar e desenvolver processos de imunoestimulação utilizando vesículas de membrana derivadas de macrófagos infectados por *Leishmania* que possam ser direcionados à prevenção da infecção leishmaniótica.

3.2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito das vesículas extracelulares derivadas de macrófagos superinfectados com *Leishmania amazonensis* sobre a infecção de macrófagos peritoneais residentes.

Avaliar o efeito das vesículas de membrana derivadas de macrófagos superinfectados com *L. amazonensis* em modelo experimental de susceptibilidade à leishmaniose tegumentar murino

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos BALB/c, de ambos os sexos, com quatro a oito semanas de idade, mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais de Experimentação do Centro (Protocolo CEUA L-003/2013).

4.2 Cultivo dos parasitos

A espécie de *Leishmania* utilizada no experimento foi isolada de pacientes e identificada como *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125). A infectividade foi mantida em camundongos BALB/c. Depois de isolados do tecido destes animais, os parasitos foram cultivados em meio de Schneider para *Drosophila* (Sigma Chemical Co, St. Louis, Miss., EUA), contendo gentamicina a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, EUA), a 23°C .

4.3 Geração e caracterização de vesículas

4.3.1 Obtenção e diferenciação de células de medula óssea em macrófagos

Camundongos BALB/c, de ambos os sexos, entre seis a oito semanas, foram eutanasiados em câmara de CO_2 . Após as remoções dos fêmures, os tecidos musculares circundantes foram retirados e os ossos foram mantidos em HBSS (*Hank's balanced salt solution*, do inglês) com cálcio e magnésio. Em fluxo laminar, com o auxílio de uma seringa de 5 mL e uma agulha 25x7, a medula foi removida através de lavagens com RPMI completo (RPMI suplementado com 10% de SFB, gentamicina a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, bicarbonato de sódio a $3,6 \text{ g.L}^{-1}$, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico) a 25mM e glutamina a 2 mM) contendo 30% de sobrenadante da cultura de células X-63 (linhagem celular transfectada com o cDNA para GM-CSF) (ZAL et al., 1994). As células foram coletadas em um tubo de 15 mL e os grumos celulares desfeitos através da homogeneização com auxílio de uma pipeta Pasteur. O conteúdo de três ou quatro medulas foi plaqueado em placas plásticas de microbiologia simples, as quais foram vedadas com parafilme. As placas foram mantidas em estufa a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 , durante sete dias. No terceiro dia foram adicionados mais 8 mL de meio RPMI completo contendo 30%

de sobrenadante da cultura de células X-63. No sétimo dia, os macrófagos foram removidos das placas lavando-se três vezes a placa com HBSS gelado (4° C) sem cálcio e sem magnésio, transferindo-se os lavados contendo os macrófagos para um tubo de 50 mL. O lavado foi centrifugado a 500 g durante 10 minutos a 4° C e as células precipitadas ressuspensas em RPMI completo para contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionadas $1,8 \times 10^7$ células por garrafa de 150cm³ ou 2×10^5 células por poço de placa de 24 poços contendo meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante da cultura de células X-63.

4.3.2 Infecção dos macrófagos

Foram adicionadas $1,8 \times 10^7$ macrófagos em garrafas plásticas de cultura contendo 20 mL de meio RPMI completo e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultivo foram lavadas três vezes com salina estéril por centrifugação a 1258 g, 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem, os parasitos foram ressuspensos em 1 mL de RPMI completo e, em seguida, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para que fosse adicionado uma proporção de 50 parasitos por macrófago. A cultura foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante seis horas. As leishmânias que não foram internalizadas nesse período foram removidas por lavagem com HBSS sem cálcio e magnésio. Após a lavagem foi adicionado 20 mL de meio RPMI completo na garrafa que foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante nove dias. No nono dia o sobrenadante foi coletado para a produção das vesículas de membrana.

4.3.3 Produção de vesículas de membrana a partir de macrófagos

O sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados por *L. amazonensis* foi coletado após nove dias de cultivo e passou por seis etapas de centrifugação em diferentes rotações. Na primeira etapa o sobrenadante foi centrifugado a 500 g durante 10 minutos, em seguida foi centrifugado duas vezes a 1500 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 8000g durante 5 minutos. Essas primeiras etapas foram realizadas para a eliminação de células residuais e detritos celulares. Finalmente, para a obtenção das vesículas de membrana o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100000g durante 45 minutos. As vesículas foram ressuspensas em HBSS sem cálcio e sem magnésio e lavadas por centrifugação a 100000g durante 45 minutos. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a

4°C. As vesículas e os sobrenadantes da última lavagem foram mantidos a -70°C até o momento do uso.

4.3.4 Caracterização das vesículas

As amostras de vesículas derivadas de macrófagos não infectados (VE) e infectados com *L. amazonensis* (VELa) foram rastreadas utilizando o equipamento NanoSight LM10 (tecnologia NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*) e uma câmera sCMOS. Os dados foram coletados a 20°C e analisados 26.13 frames por segundo com medições a cada 30 segundos. Utilizando a propriedade da dispersão da luz e do movimento Browniano determinou-se a distribuição do tamanho das partículas e bem como a sua concentração em partículas/mL. As vesículas estavam suspensas em solução de HBSS e foram aplicadas no aparelho com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Para controle (branco) foi utilizado o HBSS e as amostras foram lidas em triplicata. Foi obtido como resultado final a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração.

4.3.5 Dosagem de proteínas

A quantificação das proteínas presentes nas preparações de VE, de VELa e dos sobrenadantes, foi realizada seguindo as recomendações do fabricante do kit BCA (Thermo Scientific, Rockford, USA).

4.4 Avaliação do efeito de VEs derivadas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* e não infectados na infecção *in vitro*

4.4.1 Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais residentes, os camundongos BALB/c foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada três vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9% (Salina - Farmace, Barbalha, CE) contendo heparina (20 U.I./mL). O lavado peritoneal foi centrifugado a 300 g durante 10 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 25 mM de HEPES (pH 7,4), 2 mM de glutamina, bicarbonato de sódio 2 g/L e 10% de SBF. As células foram plaqueadas e incubadas *overnight* a 35°C e a 5% de CO₂.

4.4.2 Separação de promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*

Promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultivo foram isoladas por gradiente de Ficoll-Paque como descrito por Spath e Berveley (2001). Inicialmente, os parasitos foram lavados em meio DMEM completo a 1781 g por 10 minutos. Após a centrifugação o sedimento foi ressuspensso em DMEM completo e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Em seguida, para a obtenção das formas metacíclicas, 2×10^8 parasitos foram adicionados em 2 mL de DMEM e sob este volume foram adicionados 2 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) 10% diluído em Meio 199 (Sigma-Aldrich) e 2 mL de Ficoll-Paque a 40% diluído em PBS. O gradiente foi submetido à centrifugação a 365 g a 25°C por 10 minutos com a desaceleração ajustada para zero. As metacíclicas acumuladas na fase do Ficoll 10% foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1781 x g por 10 minutos a 25°C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e os parasitos utilizados na proporção de 5:1 macrófago.

4.4.3 Tratamento dos macrófagos residentes com vesículas de membrana e infecção

Os macrófagos residentes foram distribuídos em placas de 24 poços (2×10^5 /poço) e, após a incubação *overnight*, os poços foram lavados com solução salina para a remoção das células não aderentes. Os macrófagos foram incubados por 8 horas com VE (vesículas extracelulares de macrófagos não infectados), VELA (vesículas extracelulares de macrófagos superinfectados com *L. amazonensis*) ou apenas com meio. As concentrações de vesículas utilizadas foram as mesmas que se encontravam nos sobrenadantes das culturas de macrófagos que as produziram no nono dia de cultivo. Após o tratamento, as células foram infectadas com *L. amazonensis* em fase metacíclica na proporção de 5:1. Transcorridas 3 horas de infecção, as células foram lavadas para a remoção dos parasitos que não foram internalizados e reincubadas por tempo adicional de 45 horas. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos e armazenadas a 4°C. Por fim, as células foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl 0,9%) e as lâminas foram montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR). A percentagem de células infectadas e a carga parasitária foram determinadas pela contagem de 400 células por lâmina em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x.

4.5 Avaliação do efeito imunomodulador de VEs derivadas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* e não infectados em modelo experimental murino

4.5.1 Imunizações

Quatro grupos com oito camundongos BALB/c receberam três injeções intradérmicas (40 µg de proteína em cada dose), em intervalos de 21 dias, de vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou não infectadas ou o sobrenadante da última lavagem ou salina.

4.5.2 Infecção e acompanhamento da lesão

Dez dias após a última injeção, os animais foram infectados com *L. amazonensis* (1×10^5 parasitos) no coxim da pata traseira por via intradérmica. A evolução das lesões nos camundongos foi acompanhada durante seis semanas após a infecção, através de medida semanal do tamanho da lesão, que é expresso pela diferença das medidas entre a pata infectada e a não infectada utilizando paquímetro digital de precisão.

4.5.3 Quantificação da carga parasitária

Para determinar o número de parasitos nas lesões das patas infectadas, foi realizado o ensaio de diluição limitante, de acordo com Lima e colaboradores (1999). Resumidamente, a pata infectada foi removida assepticamente, macerada em 1,5 mL de Schneider e em seguida, centrifugada a $1540 \times g$, por 10 minutos a 4°C . O sedimento foi ressuspensionado em 0,7 mL de Schneider com 10% de SBF. Numa placa de 96 poços foi realizada a diluição seriada (fator de diluição = 10; de 10^0 até 10^{11}) das amostras em triplicata. As placas foram incubadas a 24°C durante sete dias. No último dia, o número de parasitos em cada lesão foi determinado por fórmula matemática onde o inverso do último fator de diluição onde foi encontrado promastigotas viáveis é multiplicado pela razão do volume utilizado para ressuspender o sedimento (0,7mL) sobre o volume final de cada poço (180 µL). Matematicamente temos:

Carga parasitária

$$= (\text{último fator de diluição})^{-1} \times \frac{\text{volume utilizado para ressuspender o sedimento}}{\text{volume final em cada poço}}$$

4.5.4 Dosagem de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*

Para a semiquantificação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*, poços de placas de 96 poços foram sensibilizados, por incubação *overnight*, a 4°C, com o extrato de amastigotas de *Leishmania amazonensis* (100 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M), pH 9,6. As placas foram bloqueadas por incubação com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e 10% de gelatina. As amostras do soro dos animais foram diluídas a 1:1000 (IgG e IgG1) e 1:20 (IgG2a) em PBS-T, com 5% de gelatina, adicionadas aos poços e incubadas durante 1 hora à 24°C. Os anticorpos ligados foram detectados por incubação com anticorpos anti- IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo biotinilados (Pharmingen, Minneapolis, EUA) durante 1 hora, seguido de incubação com um conjugado de avidina-peroxidase durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida em tampão de citrato-fosfato (50 mM), pH 5,2, contendo o-fenilenodiamina (1,1 µM) e H₂O₂. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ (4 M). A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 490 nm.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das vesículas

Foi realizado o rastreamento das vesículas para caracterizar a suspensão gerada em cada poço. A Figura 2 mostra imagens das vesículas obtidas através de *software* acoplado ao microscópio. As imagens são correspondentes a um dos "frames" gravados para a realização da análise do tamanho de partícula. É possível observar que as vesículas possuem formato esférico. As análises de distribuição de tamanho das vesículas extracelulares são apresentadas na Figura 3.

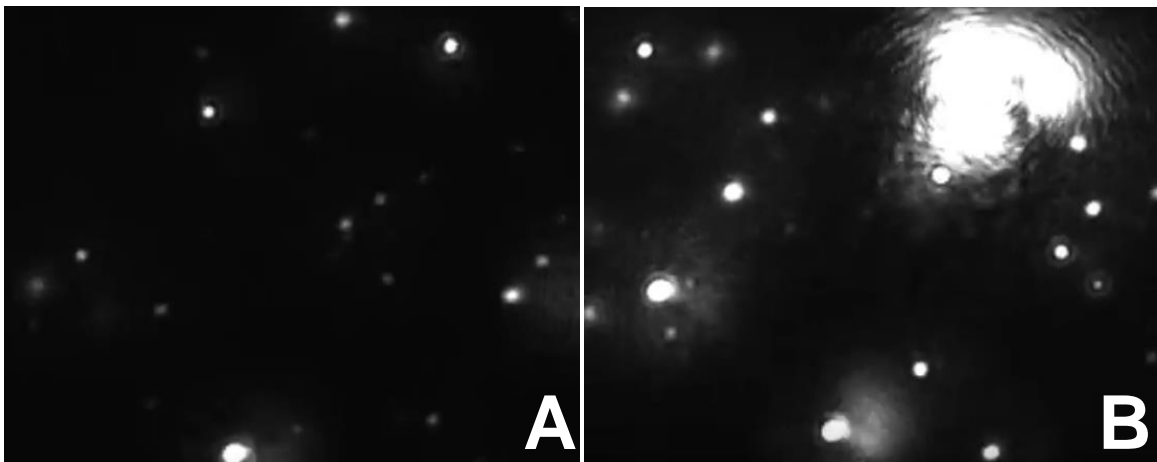


Figura 2. "Frame" do vídeo gravado para as análises das vesículas. A. VE. B. VELA.

Para as vesículas extracelulares geradas a partir de macrófagos infectados com *L. amazonensis* foi obtido diâmetro médio de 160 nm e concentração de $2,72 \times 10^9$ partículas/mL. Para as vesículas derivadas de macrófagos não infectados o diâmetro foi de 180 nm e a concentração de $1,6 \times 10^9$ partículas/mL.

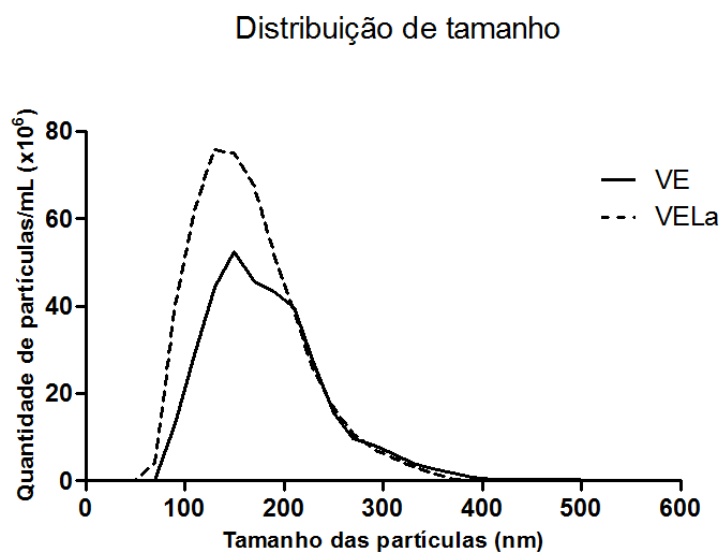


Figura 3. Distribuição do tamanho das vesículas em função da concentração. As análises foram realizadas a 24° C, totalizando um n=3. A linha contínua é correspondente à distribuição das vesículas de macrófagos não infectados e a linha tracejada corresponde às vesículas geradas a partir de macrófagos infectados.

5.2 Avaliação do efeito de VEs derivadas de macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis* *in vitro*

Com o intuito de avaliar o efeito das vesículas na infecção por *L. amazonensis*, macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c foram tratados com as vesículas durante oito horas e em seguida infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Após 48 horas de infecção, não foi observada diferença estatisticamente significativa no percentual de infecção (Figura 4). De forma similar, não houve diferença estatística no número de parasitos internalizados por célula (Figura 5).

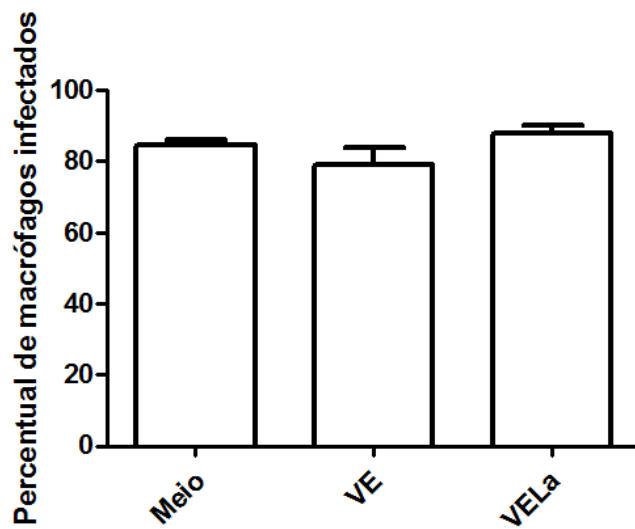


Figura 4. Percentual de macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais residentes foram incubados durante oito horas com meio, VE ou VELa. Em seguida os macrófagos foram infectados com 5:1 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Cada barra representa o resultado obtido em quadruplicata.

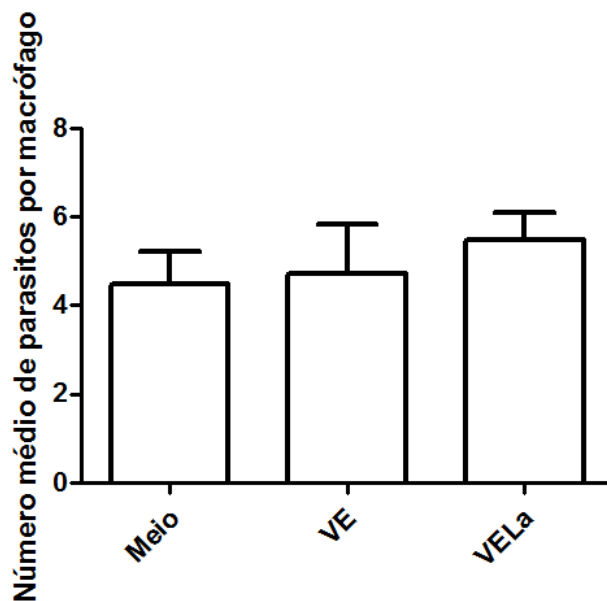


Figura 5. Carga parasitária nos macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais residentes foram tratados durante oito horas com meio, VE ou VELa. Em seguida os macrófagos foram infectados com 5:1 promastigotas metacíclicas. Cada barra representa o resultado obtido em quadruplicata.

5.3 Avaliação do efeito das vesículas em modelo de leishmaniose tegumentar murino

Após a infecção por *L. amazonensis*, foi observado o aumento progressivo do tamanho da lesão nos animais de todos os grupos. A administração das vesículas não alterou o tamanho médio das lesões causadas por *L. amazonensis* após 11 semanas de infecção (Figura 6A). Apesar de não haver diferença no tamanho da lesão desenvolvida, as imunizações com o sobrenadante e vesículas foram capazes de aumentar significativamente o número de parasitos por lesão em relação aos animais que receberam salina (Figura 6B).

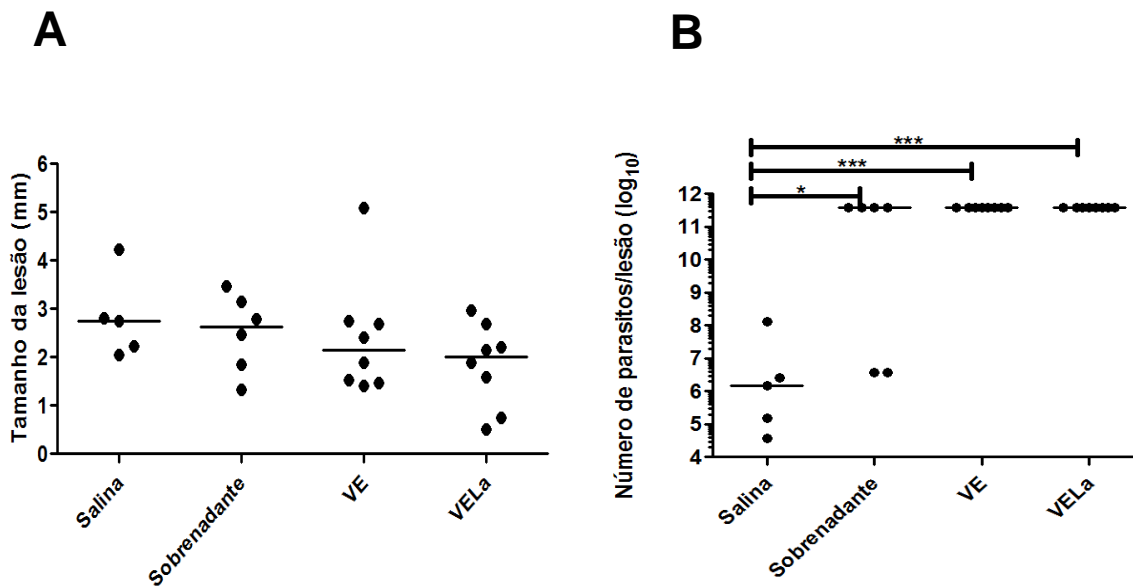


Figura 6. Efeito da imunização com vesículas extracelulares sobre o desenvolvimento de leishmaniose experimental. Os animais foram imunizados com três injeções intradérmicas, em intervalos de 21 dias, o grupo controle recebeu salina e os outros grupos receberam o sobrenadante da última lavagem ou vesículas extracelulares derivadas de macrófagos não infectados (VE) ou infectados *L. amazonensis* (VELa). Dez dias após a última imunização, os animais foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultivo. Cada círculo representa o resultado obtido de um animal e as linhas horizontais representam a média do grupo. **A.** tamanho da lesão dos animais 11 semanas após a infecção. **B.** carga parasitária nas patas dos animais determinada por diluição limitante. A análise estatística foi realizada pelo teste Kuskal-Wallis com pós teste de Dunn, *p < 0,05, ***p < 0,001.

Não foi observada diferença na produção sérica de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania* entre os grupos (Figura 7A, B e C, respectivamente).

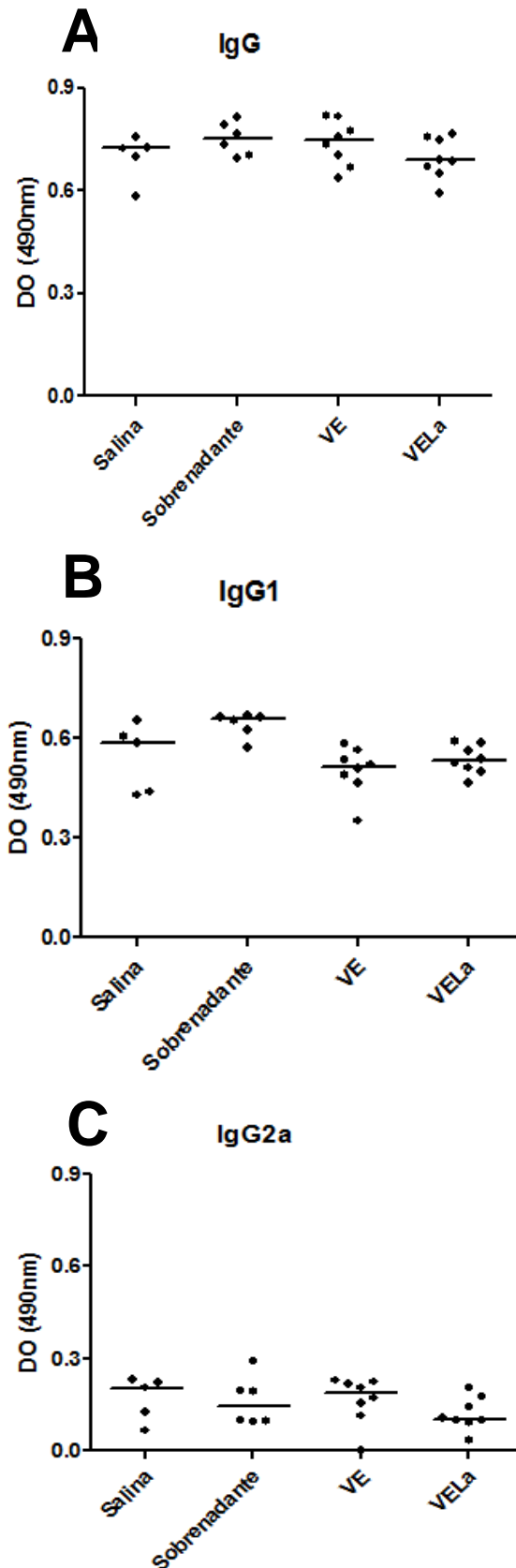


Figura 7. Semiquantificação de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). Semiquantificação de anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA, do soro de camundongos BALB/c. Os animais foram imunizados com três injeções intradérmicas, em intervalos de 21 dias, o grupo controle recebeu salina e os outros grupos receberam o sobrenadante da última lavagem ou vesículas extracelulares derivadas de macrófagos não infectados ou infectados com *L. amazonensis*. Dez dias após a última imunização, os animais foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultivo. Cada círculo representa o resultado obtido de um animal e as linhas horizontais representam a média do grupo.

6. DISCUSSÃO

Vesículas secretadas por células infectadas possuem quantidades de moléculas do patógeno que são suficientes para induzir modificações nas células não infectadas ou podem servir como apresentadoras de antígeno para o sistema imune. Isso já foi demonstrado em células infectadas por *Leishmania* (**HASSANI & OLIVIER, 2013**), vírus Epstein-barr (**KOOPERS-LALIC et al., 2014**), e *Mycobacterium* (**BHATNAGAR & SCHOREY, 2007**), entre outros patógenos.

Em um artigo publicado por Cronemberger-Andrade e colaboradores (2014), foi mostrado, *in vitro*, que vesículas geradas a partir de macrófagos infectados por *L. amazonensis* são capazes de estimular a produção de IL-12, IL-1 β e TNF- α por macrófagos *naïve*. Essas citocinas caracterizam uma resposta pró-inflamatória e a estimulação desse tipo de resposta pode ter, portanto, grande relevância para a prevenção da leishmaniose.

Nessa perspectiva foi avaliado o efeito dessas vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis* tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O rastreamento pelo NanoSight confirmou a produção das vesículas. Além da presença, foi possível observar o formato esférico e o tamanho dessas partículas (Figura 2). De acordo com as classificações de tamanho encontradas na literatura é possível que as vesículas geradas possam se constituir de um misto de exossomos (40-100 nm) e micropartículas (50-1000 nm) (**RATAJCZAK et al., 2006; SIMONS & RAPOSO, 2009**), sendo afastada, devido ao tamanho, a possibilidade da presença de corpos apoptóticos que possuem de 1 a 5 μ m.

Células sob ativação ou em estado apoptótico liberam maior quantidade de vesículas extracelulares (**THERY et al., 2009**). Em conformidade com o descrito na literatura foi observada maior produção de VELA em comparação com as vesículas produzidas pelas células não infectadas (Figura 3). Entretanto, não é possível afirmar que as células infectadas produziram maior quantidade como consequência de sua ativação ou se houve uma adição das VEs produzidas pelas células com as vesículas produzidas pelo próprio parasito. Visto que já foi descrito que a *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. majora* é capaz de liberar vesículas tanto na forma amastigota, quanto na forma promastigota (**SILVERMAN et al., 2010**).

Não foi investigado nesse trabalho o conteúdo das vesículas geradas, ou seja, se eram exclusivamente de origem macrofágica ou se havia também a

presença de vesículas originadas a partir do protozoário. Essa informação seria importante para entender melhor os dados obtidos nos experimentos, visto que foi demonstrada a presença de fatores de virulência como o GP63 em vesículas de *L. major* (HASSANI *et al.*, 2014). Além disso, é comprovada a presença de sequências de RNA em vesículas de *L. donovani* e *L. braziliensis*, com potencial função regulatória (LAMBERTZ *et al.*, 2015). Acredita-se que essas vesículas possam determinar a forma e a gravidade da infecção (HASSANI *et al.*, 2014).

Não existem dados na literatura que mostrem os efeitos *in vitro* de vesículas originadas a partir de macrófagos infectados com *Leishmania* sobre células infectadas. No nosso trabalho foi observado que o tratamento dos macrófagos *naive* com as vesículas antes da infecção por *L. amazonensis* não foi capaz de interferir no percentual de células infectadas (Figura 4) e nem na carga parasitária (Figura 5). Alguns estudos comprovaram potencial atividade pró-inflamatória de vesículas originadas de macrófagos infectados por *Leishmania* sp. sobre macrófagos *naive*, o que pode indicar efeito protetor na infecção leishmaniótica. Por exemplo, Hassani e Olivier (2013) realizaram análise funcional e proteômica do efeito de exossomos originados a partir de macrófagos J774 infectados ou não por *L. mexicana*. Os autores observaram a estimulação de expressão de genes que induzem a expressão de citocinas da família IL-1 e de PRRs, entretanto eles não pesquisaram se houve, de fato, a produção ou secreção dessas moléculas visto que existem várias etapas de regulação gênica nas células. Contudo em 2014, Cronemberger-Andrade e colaboradores demonstraram que vesículas de macrófagos originados da medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* são capazes de induzir a produção citocinas de perfil Th1 por macrófagos peritoneais *naive* de animais da mesma linhagem, o que reforça o potencial protetor dessas vesículas em experimentos realizados *in vitro*. É descrito na literatura que o parasito é capaz de inibir as funções dos macrófagos mesmo que eles tenham sido ativados com LPS ou IFN- γ (revisto por SHIO *et al.*, 2012). Desta maneira, não se pode descartar a hipótese de que os efeitos das vesículas sobre macrófagos *naive* tenham sido inibidos após a infecção dessas células por *Leishmania*. Além disso, uma deficiência no estudo do efeito dessas vesículas pode ter sido a utilização de concentrações arbitrárias (HASSANI & OLIVIER, 2014). Sendo assim, é possível que a concentração utilizada não tenha sido suficiente para interferir na infecção *in vitro*.

Apesar dos resultados anteriores confirmarem que a incubação de macrófagos com as vesículas não altera a infecção por *L. amazonensis*, foi observado se essas vesículas eram capazes de interferir na infecção *in vivo*, levando em consideração que há a produção de citocinas relacionadas a resistência a infecção por *Leishmania* após incubação de macrófagos com VELA (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014). Os camundongos BALB/c tratados com salina, VE ou VELA e infectados com 1×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de cultivo desenvolveram lesões progressivas. Não houve diferença estatística entre os grupos de camundongos (Figura 6A). Além disso, ao contrário do que se imaginava, os animais do grupo controle positivo (salina) apresentaram cargas parasitárias menores do que os animais que foram imunizados com VE, VELA e também com o sobrenadante da última lavagem das vesículas (Figura 6B). Esse resultado indica que as imunizações com as vesículas exacerbaram a infecção em modelo murino. O efeito da exacerbação observado no grupo em que foi administrado o sobrenadante indica que, possivelmente, havia vesículas no sobrenadante da última lavagem, e para afastar esse efeito, seria necessário realizar mais lavagens durante o processo de geração das vesículas.

Não foi observada diferença estatística na produção de IgG, IgG1 ou de IgG2a (Figura 7), o que corresponde ao esperado visto que todos os animais desenvolveram doença progressiva e, possivelmente, uma resposta mista Th1/Th2, com predominância Th2. O modelo murino escolhido não reflete o paradigma Th1/Th2 que é observado, por exemplo, na infecção de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Neste último, os animais resistentes à infecção polarizam para uma resposta Th1 enquanto os animais suscetíveis desenvolvem resposta anti-*Leishmania* do tipo Th2 (MOCCI & COFFMAN, 1995). A suscetibilidade dos camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis* está associada com o desenvolvimento de uma resposta mista Th1 e Th2 e não à incapacidade de desenvolver um ou outro perfil (COURRET *et al.*, 2003). Em concordância com os resultados obtidos nesse trabalho, Atayde e colaboradores (2015) constataram que a administração de vesículas de *L. major* juntamente com o inóculo da mesma espécie (5×10^6 promastigotas) exacerbou a infecção em camundongos BALB/c.

Recentemente, Hassani e Olivier (2013) realizaram análise funcional dos exossomos gerados por macrófagos da linhagem J774 infectados ou não por *L. mexicana*. Com esse ensaio eles observaram que os dois tipos de vesícula foram

capazes de estimular genes do receptor 2a para adenosina (Adora2a) em macrófagos *naïve* da mesma linhagem. É descrito na literatura que a ligação da adenosina ao Adora2a estimula resposta anti-inflamatória com produção de IL-10 e redução da liberação de TNF em macrófagos (**HASKO *et al.*, 1996**). Além disso, já foi demonstrado que *L. amazonensis* utiliza esse receptor para antagonizar a inflamação em células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6J e para permitir a sua disseminação no hospedeiro (**FIGUEIREDO *et al.*, 2012**), o que poderia levar à exacerbação da infecção.

Em trabalho prévio realizado por Cronemberger-Andrade e colaboradores (2014), foi observada atividade pró-inflamatória *in vitro* dessas vesículas, o que poderia contribuir para a eliminação do parasito. Entretanto, o efeito de exacerbação da infecção encontrado com a utilização dessas vesículas *in vivo*, nos leva a algumas reflexões. Primeiramente, não se sabe a concentração fisiológica e a meia-vida dessas vesículas *in vivo*. Além disso, o efeito aditivo de vesículas de diversas origens juntamente com citocinas e outros fatores no microambiente inflamatório em modelos *in vivo* podem levar a diferentes desfechos daqueles encontrados nos ensaios *in vitro*. Sendo assim, essas vesículas podem desenvolver papel importante no processo biológico da doença e ser responsáveis pelo agravamento da infecção.

7. CONCLUSÃO

As vesículas produzidas nesse trabalho foram capazes de exacerbar a carga parasitária em modelo de leishmaniose tegumentar murino, indicando um papel importante dessas vesículas na patogênese da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT-LOUDHIA, K. et al. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitology Research*. 2011; 109(5): 1225-1232.
- ALEXANDER, J. & BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Frontiers in Immunology*. 2012; 3: 1-13.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e35671.
- ARENDSE, B. et al. IL-9 Is a Susceptibility Factor in *Leishmania major* Infection by Promoting Detrimental Th2/Type 2 Responses. *The Journal of Immunology*. 2005; 174(4): 2205–11.
- ASSREUY, J. et al. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European journal of immunology*. 1994; 24(3): 672-6.
- ATAYDE, V. et al. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Reports*. 2015; 13(5): 957-67.
- AYRES, D. C. et al. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(2): 215-20.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity*. 2002; 70(12): 6734-40.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673): 245–252.
- BARRAL, A. et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 53(3): 256-9.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 1995; 17(1): 1-9.
- BENITO-MARTIN, A. et al. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression, *Frontiers of Immunology*. 2015; 6:66.
- BEYER, C. & PISETSKY, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2010; 6(1): 21–9.
- BHATNAGAR, S. et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007; 110(9):3234-44.

BHATNAGAR, S.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *The Journal of biological chemistry*, 2007; 282(35): 25779-89.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012; 2(69): 1-9.

CARVALHO, E. et al. Cell-mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1985; 135(6): 4144-8.

CARVALHO, E. et al.. Characterization of the immune response in subjects with self healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 53(3): 273-7.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Human immunology*. 2009; 70(6): 383-90.

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

CHANNON, J. Y. et al. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of Leishmania donovani in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, 1984; 53(2): 345–55.

CHAPUT, N. et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *Journal of immunology*. 2004; 172(4): 2137-46.

CLAYTON, A. et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of cell Science*. 2005; 118(16): 3631-8.

COSTA, J. Epidemiology of the leishmaniasis in Brazil. *Gazeta Médica da Bahia*. 2005; 75: 3-17.

COURRET, N. et al. Intradermal inoculations of low doses of Leishmania major and Leishmania amazonensis metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33(12): 1373-83.

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*. 2014; 8(9): e3161.

DAVIDSON, R. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs*. 1998; 56(6):1009–18.

de SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research*. 2002; 88(12): 1013-25.

DESJARDINS, M. & DESCOTEAUX, A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997; 185(12): 2061-2068.

DOONAN, F. & COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods*. 2008; 44(3): 200–4.

DUARTE, T. A. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis*. 2012; 92(3): 218-25.

DUQUE, G. A. & DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*. 2015; 26: 32-40.

FIGUEIREDO, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *European Journal of Immunology*. 2012; 42 (5): 1203–15.

GIRI, P. K. & SCHOREY, J. S. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PloS one*. 2008; 3(6): e2461.

GIRI, P. K. et al. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *Proteomics*. 2010; 10(17): 3190-202.

GRIMALDI, G. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 1993; 6(3): 230–50.

GRIMALDI, G. et al. A review of the geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989; 41(6): 687-725.

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cellular Microbiology*. 2008; 10(1): 100–11.

GURUNG, P. & KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*. 2015; 17(9): 1286-94.

HANDMAN, E. & SPIRA, D. T. Growth of *Leishmania* amastigotes in macrophages from normal and immune mice. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1977; 53(1): 75-81.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(2): 229-43.

HASKO, G. et al. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of Immunology*. 1996; 157(10): 4634-40.

HASSANI, K. & OLIVIER, M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. PLoS neglected tropical diseases. 2013; 7(5): e2185.

HASSANI, K. et al. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. PloS one. 2014; 9(4): e95007.

HASSANI, K. et al. Temperature-induced protein secretion by Leishmania mexicana modulates macrophage signalling and function. PLoS ONE. 2011; 6(5): e18724.

HEYNEMAN, D. Immunology of leishmaniasis. Bulletin of the World Health Organization. 1971; 44(4): 499-514.

HONDOWICZ, B. & SCOTT, P. Influence of Parasite Load on the Ability of Type 1 T Cells To Control *Leishmania major* Infection. Infection and Immunity. 2002; 70(2): 498-503.

KAYE, P. & SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nature Reviews Microbiology. 2011; 9(8): 604–15.

KEVRIC, I. et al. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. Dermatologic clinics. 2015; 33(3): 579-93.

KOOJIMANS, P. et al. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. International journal of nanomedicine. 2012; 7: 1525-41.

KOPPPERS-LALIC, D. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. Cell Reports. 2014; 8(6): 1649-58.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1983; 77(5): 569-96.

LAKHAL-NAOUAR, I. et al. The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy. PLoS neglected tropical diseases. 2015; 9(10): e0004178.

LAURENTI, M. D. et al. . The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1999; 32(3): 323-5.

LIMA, G. M. et al. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. Immunology Letters. 1998; 64(2): 145-51

LIMA, H. C. et al. A Simple Method for Quantifying *Leishmania* in Tissues of Infected Animals. Parasitology Today. 1997; 13(2): 80-2.

LIU, D. & UZONNA, J. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2012; 2 (83): 1-8.

MOCCI, S. & COFFMAN, R. L. Induction of a Th2 population from a polarized Leishmania-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. *Journal of immunology*. 1995; 154(8): 3778-87.

MOLL, H. Development of helper T cell subsets: a central role for interleukin 12. *Trends in Microbiology*. 1993; 1(6): 209-10.

NARDERER, T. & McCONVILLE, M.J. The Leishmania–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology*. 2008; 10(2): 301-8.

NOLTE-T HOEN, E. N. M. et al. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*. 2009; 113(9): 1977–81.

O'NEILL, H. C. & QUAH, B. J. C. Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory. *Science signaling*. 2008; 1(6):e8.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmania- sis transmitted by sand flies. *Science*. 2008; 321(5891), 970–4.

PIRMEZ, C. et al. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *The journal of immunology*. 1990; 145(9): 3100-4.

PITTA, M. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(8): 2379-87.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology*. 1990; 145(12): 4311-6.

RATAJCZAK, J. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1487–1495.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular Microbiology*. 2014; 16(10): 1549-64.

RECORD, M. et al. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*. 2011; 81(10): 1171-82.

REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*. 1995; 13: 151-77.

REINHARDT, R. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature immunology*. 2009; 10(4): 385-93.

REITHINGER, R. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious diseases*. 2007; 7(9): 581-96.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. *The journal of immunology*. 2004. 172(7): 4454-62.

ROSTAMIAN, M. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2015; 1-7.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2(11): 845-58.

SHIO, M. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *Journal of tropical medicine*. 2012; 2012(819512).

SILVEIRA, F et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology*. 2009; 31(8): 423-31.

SILVERMAN, J. et al. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *Journal of immunology*. 2010; 185(9): 5011-22.

SIMONS, M, & RAPOSO, G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009; 21(4): 575–81.

SPATH, G. F. & BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Experimental parasitology*. 2001; 99(2): 97-103.

STAFFORD, J. L. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol*. 2002; 28(3): 187-248.

STENGER, S. et al. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994; 180(3): 783-93.

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

TERRAZAS, C. et al. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015; 1-9.

THÉRY, C. et al. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2009; 9(8): 581-93.

UENO, N. & WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitology*. 2012; 28(8): 335-44.

van der POL, E. et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2014; 12(7): 1182-92.

van ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*. 2002; 70(8): 4177-84.

WANG, Z. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. 1994; 179(4): 1367-71.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis. Situation and trends*. 2014. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>.

WIKLANDER, O. P. B. et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015; 4: 10.

WRIGHT, S. D. et al. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983; 80(18): 5699-703.

YAO, C. et al. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003; 132(1): 1–16.

ZAL, T. et al. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a bloodborne self-antigen. *The Journal of Experimental Medicine*. 1994; 180(6): 2089–99.

ZWAAL, R. F. & SCHROIT, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 1997; 89(4): 1121-32.