



INSTITUTO DE HIGIENE E  
**MEDICINA TROPICAL**  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Vesículas extracelulares de *Leishmania amazonensis*: activação  
de macrófagos murinos e antigenicidade

**Bruna Eugênia de Freitas**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA

Dezembro, 2021



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Vesículas extracelulares de *Leishmania amazonensis*: activação  
de macrófagos murinos e antigenicidade

**Autor:** Bruna Eugênia de Freitas

**Orientador:** Gabriela Santos-Gomes

**Coorientador:** Hélida Monteiro de Andrade

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Parasitologia Médica

Estudo financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia I.P. através do projeto PTDC/CVT-  
CVT/28908/2017

**FCT** Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia

*Dedico este trabalho àqueles que me inspiraram e apoiaram: a Deus, que sempre me estende a mão. Aos doentes portadores de doenças negligenciadas, minha maior fonte de inspiração. Ao meu pai (in memoriam), com muitas saudades. À minha mãe, exemplo de perseverança. Ao Alexandre, que me deu todo o suporte necessário para prosseguir! Às queridas filhas Amanda, Elisa e Renata, que vocês tenham sempre boas inspirações! Por fim, dedico este trabalho à Ciência!*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, agradeço imensamente a todo o apoio e direcionamento dados. Fazer uma pesquisa científica em meio ao caos provocado pela pandemia parecia impossível. Mas sua resiliência e experiência me permitiu contornar todos os obstáculos. A cada desafio, a senhora tinha uma solução. Sou muito grata por ter aceitado esta orientação, pela riqueza de conteúdo científico em nossas reuniões e pela delicadeza de suas palavras para as devidas correções. Tive muito orgulho em fazer parte de sua equipe!

À minha coorientadora Professora Doutora Héliida Monteiro de Andrade, minha sincera e profunda gratidão. Com a necessidade de retornar ao Brasil, a angústia da possibilidade de interromper o Mestrado foi superada pela sua acolhida em seu laboratório no ICB. Com seu saber científico impecável e a característica de sempre ir além, me impulsionou e enriqueceu este trabalho. E toda esta qualidade profissional agregada à qualidade emocional, num ambiente de total integração da equipe!

Ao Professor Doutor Rodrigo Pedro Soares, Instituto René Rachou/FIOCRUZ, pela colaboração no fornecimento das estirpes utilizadas e na análise das vesículas.

À Professora Graça Alexandre-Pires, pela colaboração nas imagens das nano vesículas.

À Armanda Rodrigues, por todo o apoio nos experimentos, pela paciência em ensinar, pelas sugestões de leitura e por dividir conhecimento. À Joana Palma, Ana Sofia Bolas e Lis Lobo, por todo o apoio no Laboratório de Imunologia Parasitária e Desenvolvimento de Vacinas – IHMT/UNL.

A todos os colegas do Mestrado, em especial Juliana Weber e Kátia Azevedo, pela troca de conhecimento e experiências, pela ajuda mútua e apoio ao longo de todo o curso.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Leishmanioses – ICB/UFMG: Ramon Nunes, Jordanna Celeste, Bárbara Beiral, Bruna Rodrigues, Thabata Lopes, João Carlos França e Elaine Amaral. Muito obrigada pela constante ajuda nos experimentos, por auxiliarem nas dúvidas, na execução dos experimentos e pela agradável companhia durante este período. Trabalhar ao lado de vocês foi muito bom! À Adriana Raabe, pela valiosa ajuda nos experimentos, sempre com muita disponibilidade e uma educação ímpar. À Daniela Reis pelo apoio dado na interpretação dos resultados de citometria de fluxo.

**Resumo**

Leishmanioses são um grupo de doenças, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem e outros mamíferos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Há duas formas clínicas principais da doença: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), sendo a última subdividida em leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose difusa e leishmaniose disseminada. As leishmanioses pertencem ao grupo de doenças negligenciadas, que são responsáveis pela morte e incapacidade de milhões de pessoas por ano, evidenciando uma necessidade de atenção. O papel das vesículas extracelulares (VEs) de parasitas do gênero *Leishmania* tem sido amplamente estudado, uma vez que, nos últimos anos, os resultados apontam para uma função imunomoduladora favorável à infecção. Este trabalho teve como objetivo analisar a imunogenicidade das proteínas das VEs de formas promastigotas de três estirpes de *L. amazonensis* e investigar o efeito das VEs na ativação de macrófagos murinos. Este estudo foi constituído por três etapas: (i) VEs de culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis*, estirpes M2269, BA125 e BA336, foram purificadas; (ii) foi analisado o efeito das VEs na atividade dos MØ, pela quantificação da produção de ureia, através de ensaios colorimétricos e pela produção de IL-1 $\beta$ ; a atividade dos MØ como células apresentadoras de antígeno foi avaliada indiretamente, através da expressão de moléculas de classe I (MHC I) e de classe II (MHC II) do complexo maior de histocompatibilidade, por citometria de fluxo; (iii) foi estudado o perfil e imunorreatividade das proteínas das VEs, utilizando como ferramentas a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), a eletroforese bidimensional (2-DE) e teste de *Western-blot* das proteínas, utilizando soro de camundongos infectados por *L. amazonensis* e soro de humanos portadores de Leishmaniose tegumentar americana (LTA). Os MØ estimulados com VEs a 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L produziram significativamente mais ureia que o controlo negativo. A estimulação com VEs provocaram, nos MØ, a redução da produção de IL-1 $\beta$ , em relação à produção basal do controlo negativo. As VEs de *L. amazonensis* não interferem com a expressão das moléculas de classe I e II do MHC. A eletroforese das VEs em SDS-PAGE evidenciou um perfil proteico semelhante nas estirpes BA125 e BA336, mas diferente na estirpe M2269. As VEs possuem proteínas que foram reconhecidas por anticorpos de camundongos BALB/c previamente infetados com *L. amazonensis*, assim como por anticorpos de humanos portadores de LTA. As VEs de *L. amazonensis* partilham proteínas com o parasita, nomeadamente a proteína de superfície gp63 e a proteína citoplasmática HSP70, não promovem ambientes pro-inflamatórios e evitam estimular a apresentação antigénica, minimizando a actividade da imunidade celular e favorecendo a infecção e a sobrevivência do parasita. Estudos futuros são necessários para clarificar os efeitos das VEs na LTA, incluindo a identificação de outras proteínas, que podem exercer um papel importante no microambiente imunitário.

**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*, vesículas extracelulares, polarização de macrófagos, antigenicidade, gp63, HSP70.

**Abstract**

Leishmaniasis is a group of diseases, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which is transmitted to man and other mammals through the bite of selected sand flies. There are two clinical forms of the disease: visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL). CL is subdivided into cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, diffuse leishmaniasis, and disseminated leishmaniasis. They belong to the neglected diseases group, which is responsible for millions of people's death and disability each year, highlighting the need for attention. The role of extracellular vesicles (EVs) from *Leishmania* parasites has been widely studied since, in recent years, results have pointed to an immunomodulatory function favorable to infection. This work aimed to analyze the immunogenicity of EV proteins from promastigote forms of three *L. amazonensis* strains and investigate the effect of their EVs in the activation of murine macrophages. This study was organized in three phases: (i) EVs from axenic cultures of *L. amazonensis* promastigotes, strains M2269, BA125, and BA336 were purified; (ii) the effect of VEs on MØ activity was analyzed by quantifying urea through colorimetric assays and IL-1 $\beta$  production, and the activity of MØ as antigen-presenting cells was indirectly evaluated through the expression of class I (MHC I) and class II (MHC II) molecules of the major histocompatibility complex by flow cytometry. Finally, EVs proteins' profile and immunoreactivity were investigated by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of SDS (SDS-PAGE), two-dimensional electrophoresis (2-DE) and Western-blot test using serum from mice infected with *L. amazonensis* and serum from humans with American Cutaneous Leishmaniasis (ATL). MØ stimulated with EVs a 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L produced more urea than the negative control. The stimulation with EVs caused in MØ a reduction in the production of IL-1 $\beta$ , concerning the basal production of the negative control. *L. amazonensis* EVs do not interfere with the expression of class I and II molecules of MHC. EV electrophoresis on SDS-PAGE showed a similar protein profile in strains BA125 and BA336, but different in strain M2269. EVs have proteins that are recognized by BALB/c mice previously infected with *L. amazonensis* and by humans with ATL. *L. amazonensis* EVs share antigens with the parasite, such as the surface gp63 and the cytoplasmic HSP70, do not promote pro-inflammatory environments and avoid stimulating antigenic presentation, minimizing the activity of cellular immunity, favoring infection and parasite survival. Further studies are needed to clarify the effects of EVs on LTA, including the identification of other proteins which can play an important role in the immune microenvironment.

**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, extracellular vesicles, macrophage polarization, antigenicity, gp63, HSP70.

Índice	
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	viii
1 - Introdução.....	1
1.1- Leishmanioses.....	1
1.1.1 - Leishmaniose visceral.....	2
1.1.2 - Leishmaniose tegumentar.....	2
1.2- Impacto da doença no mundo.....	4
1.3- Imunidade.....	4
1.3.1 - Imunidade inata.....	5
1.3.2 - Imunidade adaptativa.....	5
1.4- Os macrófagos e seus fenótipos.....	6
1.5- Evasão da resposta imune na leishmaniose tegumentar.....	7
1.6- Vesículas extracelulares no gênero <i>Leishmania</i> .....	8
2- Objetivos.....	10
3 - Materiais e métodos.....	11
3.1 – Desenho experimental.....	11
3.2 – Animais e Parasitas.....	13
3.2.1 – Camundongos.....	13
3.2.2 – Parasitas.....	13
3.3 - Macrófagos.....	14
3.4 - Purificação das vesículas extracelulares (VEs) de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	14
3.4.1 – Purificação de VEs através de kit comercial de colunas.....	15
3.4.2 – Purificação de VEs através do reagente comercial <i>Total Exosome Isolation</i> .....	15
3.4.3 – Purificação de VEs por ultracentrifugação.....	16
3.5 – Análise e caracterização das VEs de <i>L. amazonensis</i> .....	17
3.5.1 - Análise das VEs por rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA).....	17
3.5.2– Microscopia eletrônica de varrimento das VEs.....	17
3.5.3 – Microscopia eletrônica de transmissão das VEs.....	18
3.5.4 – Presença de proteínas marcadoras de VEs: gp63 e HSP70.....	18
3.6 - Preparação do extrato de antígenos totais de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	21
3.7 – Efeito das VEs na atividade de MØ murinos <i>in vitro</i> .....	21
3.7.1 – Produção de ureia <i>in vitro</i> , por MØ murinos estimulados por VEs de <i>L. amazonensis</i> .....	22

3.7.2 – Marcação das células com anticorpos monoclonais para citometria de fluxo .....	23
3.8 – Análise da viabilidade dos MØ, através da redução de rezasurina .....	24
3.9 - Soros anti- <i>L. amazonensis</i> de camundongos BALB/c .....	25
3.10 – Soro de humanos portadores de leishmaniose tegumentar americana (LTA) .....	26
3.11 – Caracterização das proteínas das VEs de <i>L. amazonensis</i> por SDS-PAGE e sua imunogenicidade.....	27
3.11.1 - SDS-PAGE.....	27
3.11.2 – Western-blot .....	28
3.12 – Eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas das VEs.....	29
4 – Resultados .....	31
4.1 – <i>In vitro</i> , promastigotas da espécie <i>L. amazonensis</i> libertam vesículas extracelulares	31
4.2 – As VEs de <i>L. amazonensis</i> contêm a metaloprotease gp63 .....	33
4.3 – VEs de <i>L. amazonensis</i> incluem a proteína HSP70 .....	33
4.4 – O tamanho das VEs libertadas por promastigotas de <i>L. amazonensis</i> variam com a estirpe .....	34
4.5– Diferentes metodologias de purificação de VEs apresentam rendimentos proteicos diversos.....	35
4.6 – MØ estimulados por VEs mantém a viabilidade.....	36
4.7- A concentração mais elevada de VEs promove a ativação de MØ com fenótipo M2 ..	37
4.8 – Promastigotas e VEs de <i>L. amazonensis</i> inibem a produção de IL-1 $\beta$ por MØ.....	39
4.9 – As VEs de <i>L. amazonensis</i> não interferem com a apresentação antigênica através das moléculas de classe I do MHC.....	42
4.10 – As VEs de <i>L. amazonensis</i> não interferem com a expressão constitutiva das moléculas de classe II dos MØ murinos .....	45
4.11 – Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> infectam camundongos.....	48
4.12 – As VEs de <i>L. amazonensis</i> são constituídas por frações proteicas com massa molecular acima de 21kDa .....	50
4.13 – Os soros de camundongos infetados por <i>L. amazonensis</i> são reativos às VEs.....	50
4.14 – Soro de humanos portadores de LTA apresenta imunorreatividade para as VEs ..	51
4.15 - VEs de <i>L. amazonensis</i> contém proteínas de alto, média e baixa massa molecular ..	52
4.16 – As proteínas das VEs de massa molecular elevada possuem imunorreatividade ao soro de humanos portadores de LTA .....	53
5 – Discussão.....	54
6 - Conclusões .....	61
7 – Bibliografia .....	63

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo da sequência do trabalho experimental. ....	12
<b>Figura 2</b> - Programação da corrente elétrica aplicada para focalização isoeletrica das strips de 7cm.....	30
<b>Figura 3</b> - Imagem representativa de VEs de <i>L. amazonensis</i> em microscopia eletrônica de transmissão (MET). ....	31
<b>Figura 4</b> - Imagem representativa da morfologia do promastigota da espécie <i>Leishmania amazonensis</i> e das nanovesículas.....	32
<b>Figura 5</b> – Detecção da presença de gp63 nas VEs de <i>L. amazonensis</i> . ....	33
<b>Figura 6</b> - Imagem representativa da identificação da proteína HSP70 em VEs. ....	34
<b>Figura 7</b> - Tamanho, densidade e intensidade das VEs libertadas por <i>L. amazonensis</i> - .....	35
<b>Figura 8</b> – Viabilidade dos MØ após a estimulação com VEs.....	38
<b>Figura 9</b> - Produção de ureia por MØ não estimulados e estimulados por PMA.....	38
<b>Figura 10</b> - Produção de ureia por MØ estimulados por VEs de <i>L. amazonensis</i> . ....	39
<b>Figura 11</b> – MØ não marcados com anti-IL-1 $\beta$ . ....	40
<b>Figura 12</b> - Produção de IL-1 $\beta$ por MØ controlo. ....	41
<b>Figura 13</b> - Produção de IL-1 $\beta$ por MØ estimulados com VEs. ....	41
<b>Figura 14</b> – Plots representativos da produção de IL-1 $\beta$ por MØ estimulados com VEs. ....	42
<b>Figura 15</b> - MØ não marcados com anti-MHC I.....	43
<b>Figura 16</b> – Frequência de MØ MHC I <sup>+</sup> nas populações de MØ controlo. ....	44
<b>Figura 17</b> – Frequência de MØ MHC I <sup>+</sup> nas populações de MØ estimuladas por VEs.....	44
<b>Figura 18</b> – Plots representativos da frequência de MØ MHC I <sup>+</sup> após estimulação com VEs.. .	45
<b>Figura 19</b> - MØ não marcados com anti-MHC II. ....	46
<b>Figura 20</b> – Frequência de MØ MHC II <sup>+</sup> nas populações de MØ controlo .....	47
<b>Figura 21</b> – Frequência de MØ MHC II <sup>+</sup> nas populações de MØ estimuladas por VEs.....	47
<b>Figura 22</b> – Plots representativos da frequência de MØ MHC II <sup>+</sup> estimulados com VEs.. ..	48
<b>Figura 23</b> – Formas amastigotas em camundongos infetados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> . ....	49
<b>Figura 24</b> – Gráfico representativo do nível de anticorpos IgG anti <i>L. amazonensis</i> nos camundongos experimentalmente infetados. ....	49
<b>Figura 25</b> – Imagem representativa da eletroforese proteica das VEs.....	50
<b>Figura 26</b> – Imagem representativa das bandas proteicas das VEs reconhecidas por soro de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	51
<b>Figura 27</b> – Imagem representativa das bandas proteicas das VEs reconhecidas por soro de humanos portadores de LTA.....	52
<b>Figura 28</b> - Separação das proteínas das VEs de <i>L. amazonensis</i> por eletroforese bidimensional.. ..	52
<b>Figura 29</b> – Eletroforese bidimensional de VEs de <i>L. amazonensis</i> e Western blot com soro de humanos portadores de LTA.....	53
<b>Figura 30</b> – Actividade e composição de VEs de <i>L. amazonensis</i> . ....	61

**Índice de tabelas**

Tabela 3. 1– Citometria de fluxo.....	24
Tabela 4. 1– Concentração proteica das VEs de <i>L. amazonensis</i> . ....	36
Tabela 4. 2– Viabilidade de MØ, estimulados com VEs de <i>L. amazonensis</i> .....	37

**Lista de abreviaturas**

2-DE – Eletroforese Bidimensional

ANOVA – análise de variância

*APC* - Allophycocyanin

APC – Células Apresentadoras de Antígeno

ATP – adenosina trifosfato

BA125 – estirpe MHOM/BR/1987/BA125

BA336 – estirpe MHOM/BR/1989/BA336

BSA – Albumina de Soro de Bovino

CCD - charge-coupled device (dispositivo de carga acoplada)

CD – cluster of differentiation

CEM – Centro de microscopia

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio] -2-hidroxi-1-propanesulfonato

CN – Controlo Negativo

CP – Controlo Positivo

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade ótica

DTT – Ditioneitol.

ECL - Enhanced chemiluminescence

EGF - fator de crescimento epidérmico

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FBS – Soro Fetal de Bovino

Fig. - Figura

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FMRP/USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

*g* – Gravidade

gp63 – Glicoproteína de 63 KDa

HCl – ácido clorídrico

HEPES - ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-2-etanossulfônico

HRP - horseradish peroxidase

HSP-70 – Proteína do Choque Térmico – 70

IAA – iodoacetamida

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IEF – focalização isoeletrica

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IgG - Imunoglobulina da classe G

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL - Interleucina

IFN  $\gamma$  - Interferon gama

kDa - kilodaltons

LC – leishmaniose cutânea

LCD – leishmaniose cutânea difusa

LD – leishmaniose disseminada

LMC – leishmaniose mucocutânea

LPG – lipofosfoglicano

LPS – lipopolissacarideo

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LV – Leishmaniose visceral

M1 – macrófagos ativados classicamente

M2 – macrófagos ativados alternativamente

M2269 – estirpe MHOM/BR/1973/M2269

MAC – complexo de ataque à membrana

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de Varrimento

MHCI – Moléculas de classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade

MHCII – Moléculas de classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade

MM – Massa Molecular

MØ – Macrófagos

NF-κB – factor nuclear kappa B

NK – Natural killer

NO – Oxido Nítrico

NOS 2 - óxido-nítrico-sintase 2

NTA – análise de rastreamento de nanopartículas

OMS – Organização mundial de saúde

OPA - ortoftaldeído

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

P2Y2R - receptor purinérgico P2Y2

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PAMPs – Padrões moleculares comuns a agentes patogénicos

PBS – Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline)

PDI - proteína dissulfeto isomerase

PE – Phycoerythrin

pH - potencial hidrogeniônico

PMA – Phorbol-12-miristato-13-acetato

PMN – células polimorfonucleares

PPG – proteofosfoglicano

Resazurina - 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido

Rf – mobilidade relativa

RIFI – reação de imunofluorescência direta

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigénio

RPM - rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SCH- Schneider

SDS – dodecil sulfato de sódio

TA – Temperatura ambiente

TEMED – tetramethylethylenediamine

TGF – Fator de crescimento tumoral

Th – T auxiliares

TLR – recetor Toll-like

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral

UTP - trifosfato de uridina

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VAMP8 – Membrana de proteína associada a vesícula 8

VEs – vesículas extra-celulares

WB - Western blot

## 1 - Introdução

### 1.1 – Leishmanioses

Leishmanioses são um grupo de doenças, causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem e outros mamíferos através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Protozoários deste gênero são da ordem *Kinetoplastida*, caracterizada por possuírem um DNA extra nuclear em seu citoplasma, em uma organela mitocondrial, o cinetoplasto. (Grimaldi, 1982). O gênero *Leishmania* é dividido nos subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Mundinia* (Schoch *et al*, 2020), sendo os dois primeiros responsáveis pelas leishmanioses transmitidas aos humanos (Lainson *et al*, 1987).

Os vetores responsáveis pela transmissão são flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomia*, nas Américas e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Alexander *et al*, 2003). No vetor, este parasita está presente na forma promastigota, uma forma flagelada móvel. Ao ser inoculado no mamífero hospedeiro, durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo, estas formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas. No citoplasma dos fagócitos, forma-se o vacúolo parasitóforo contendo o parasita. Esta organela se funde com os lisossomas, dando origem aos fagolisossomas, dentro dos quais as formas promastigotas de *Leishmania* se transformam em amastigotas, formas não flageladas. Na persistência da infecção, estas formas amastigotas se replicam no interior dessas células, até seu rompimento e disseminação para o tecido, sendo novamente fagocitadas por outras células não infectadas. Os flebotomíneos, ao picarem um hospedeiro infectado, ingerem o sangue contendo macrófagos com as formas amastigotas em seu interior. Uma vez no intestino médio deste vetor, os parasitas se transformam em promastigotas, se multiplicam, passam por metaciclogênese e migram para a probóscide do inseto, reiniciando o ciclo (McGwire *et al*, 2014).

Existem duas formas clínicas principais da doença: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). Esta última é subdividida nas formas clínicas leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco-cutânea (LMC), leishmaniose tegumentar difusa (LTD) e leishmaniose disseminada (LD). A fisiopatologia dessas formas clínicas varia conforme a espécie infectante e as condições imunológicas do hospedeiro (Torres-Guerrero *et al*, 2017; WHO, 2021).

### 1.1.1 - Leishmaniose visceral

A LV humana é causada, principalmente, por *Leishmania donovani* no subcontinente indiano e leste da África; *Leishmania infantum* no Mediterrâneo, Oriente Médio, China, partes da Ásia e África oriental, e nas Américas Central e do Sul. Outras espécies podem, ocasionalmente, visceralizar, como *L. amazonensis*. O período de incubação geralmente é de 4 a 6 meses (Charmot *et al*, 1975). As manifestações clínicas incluem febre irregular, hepatoesplenomegalia, perda ponderal e pancitopenia. Se não tratada, o índice de mortalidade alcança até 90% dos casos. O diagnóstico da LV é clínico-laboratorial, através de métodos parasitológicos, imunológicos ou moleculares. O diagnóstico e tratamento precoce reduzem essa mortalidade para 2 a 5%. O tratamento atual preconizado varia conforme a região. No subcontinente indiano, o medicamento de escolha é a anfotericina B lipossomal, embora a paromomicina também seja uma opção. A miltefosina é uma opção de medicamento oral, cuja eficácia na Índia está diminuindo, devido ao desenvolvimento de resistência pelo parasita. Na África Oriental, o tratamento é feito com uma combinação de estibogluconato de sódio e paromomicina, com alternativa ao uso da anfotericina B lipossomal. Nas Américas, preconiza-se o uso de antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio, nos Estados Unidos, e o antimoniato de meglumina nas demais áreas (Rosenthal *et al*, 2021).

A Leishmaniose dérmica pós-calazar é uma manifestação cutânea que pode ocorrer como uma seqüela da leishmaniose visceral, após a cura aparente da mesma, descrita quase exclusivamente nos casos de infecção por *Leishmania donovani*. Essa forma ocorre em até 50% dos pacientes com LV no Sudão e entre 5 a 20% no subcontinente indiano (Zijlstra *et al*, 2019). As lesões cutâneas desta entidade são consideradas uma fonte potencial de infecção (Mondal *et al*, 2018) e são consideradas um fator de impedimento para que os vários programas de controle da leishmaniose visceral tenham sucesso.

### 1.1.2 - Leishmaniose tegumentar

A LT é causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, pertencendo ao subgênero *Leishmania (Leishmania)* ou *Leishmania (Viannia)*. As espécies responsáveis por sua ocorrência no Velho Mundo são *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica*, enquanto

que nas Américas são: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. venezuelensis*, *L. shawi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (Gabriel *et al*, 2019).

Leishmaniose tegumentar pode se apresentar clinicamente com as formas cutânea, muco-cutânea, difusa e disseminada. Na forma cutânea, a lesão nodular inicial aparece entre uma semana até vários meses após a picada do vetor, podendo ser única ou múltipla. As características das lesões variam conforme a espécie e a resposta imune do hospedeiro. Geralmente, as lesões são indolores, há linfadenomegalia localizada e pode ocorrer episódios de febre. Em algumas espécies a cura é espontânea, entretanto com formação de cicatrizes muitas vezes deformantes e estigmatizantes. Recidiva e hipersensibilidade é comum nas infecções por *L. tropica*. LT difusa e LT disseminada são outras variantes dessa forma. Na leishmaniose cutânea difusa (anérgica), como a causada por *L. amazonensis*, lesões nodulares de tamanho variável surgem em vários locais distantes do local da picada do flebotomíneo (McGwire *et al*, 2014). A LT disseminada caracteriza-se pela presença de dezenas a centenas ou milhares de lesões cutâneas polimórficas em várias regiões do corpo e acometimento frequente da mucosa nasal. O diagnóstico é clínico-laboratorial, com a confirmação através de biópsia das lesões (Machado *et al*, 2019). A Leishmaniose mucocutânea é uma forma grave de leishmaniose tegumentar. Na América Latina, as lesões mucosas se desenvolvem numa pequena porcentagem da população infectada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* e algumas outras espécies. Brasil, Peru e Bolívia concentram 86,5% dos casos dessa forma cutâneo-mucosa (OPAS, 2020). Ocorre a ulceração da mucosa nasal e septo, com progressão local e extensa destruição dos tecidos moles adjacentes (boca, lábios, palato, faringe e laringe). É comum ocorrer infecção bacteriana secundária. São fatores de risco para o desenvolvimento dessa forma a desnutrição proteico-calórica e a persistência da forma cutânea por mais de quatro meses (Machado-Coelho *et al*, 2005). O Ministério da Saúde brasileiro recomenda os seguintes medicamentos para o tratamento da forma mucocutânea: antimoniato de meglumina associado à pentoxifilina (primeira escolha), anfotericina B lipossomal, desoxicolato de anfotericina B, isetionato de pentamidina (Brasil, Ministério da Saúde, 2017).

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e o risco de progressão para as formas difusa e disseminada é maior, justificando assim o tratamento em todos os casos. A terapia padrão é com os antimoniais. Outras opções são: antifúngicos, alopurinol, miltefosina ou o uso

combinado destes com os antimoniais, conforme descrito para a LV. Terapia tópica também está sendo aplicada, desde medicamentosa até cirúrgica. A forma difusa dificilmente responde ao tratamento (Rosenthal *et al*, 2021; Machado *et al*, 2019). No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea geralmente é autolimitada, com cura espontânea das lesões em alguns meses. Portanto, o tratamento se reserva a casos de lesões na face ou nas mãos, seguindo os mesmos medicamentos para a LV em cada região geográfica.

### **1.2 - Impacto da doença no mundo**

As leishmanioses pertencem ao grupo de doenças negligenciadas, que são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitários, endêmicas em regiões com população de baixa renda, cujo investimento em pesquisa, produção de medicamentos e controle é reduzido, além de apresentarem indicadores de saúde inaceitáveis. As doenças negligenciadas são responsáveis pela morte e incapacidade de milhões de pessoas por ano, evidenciando uma necessidade de atenção. A leishmaniose é considerada endêmica em 97 países, sendo 88 endêmicos para LT, 78 para LV e 69 para ambas as formas clínicas. Em 2019, foram registrados no mundo, cerca de 277.000 novos casos de LT, sendo a maioria registrados no Afeganistão, Paquistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Iraque, Tunísia e Síria (WHO, 2020). Provavelmente subnotificadas, estima-se que anualmente, ocorram 700.000 a 1.000.000 de novos casos de LT por ano e cerca de 100.000 casos de LV, no mundo (Mann *et al*, 2021).

Entre 2001 e 2019, foi registrada uma média anual de 54.000 novos casos de LT nas Américas, segundo o Informe Epidemiológico das Américas, sendo o Brasil, Colômbia, Peru, Nicarágua e Bolívia os que mais registraram casos (OPAS, 2020).

Os custos diretos do tratamento da leishmaniose muco-cutânea foram estimados em uma média de 167 a 715 dólares por paciente, dependendo do medicamento utilizado, entre os quais: meglumina, miltefosina ou anfotericina B lipossomal (Carvalho *et al*, 2021). O impacto dessa doença na saúde pública vai além dos custos do tratamento, como o ostracismo social e perda econômica.

### **1.3 – Imunidade**

A imunidade é a capacidade de um organismo estar protegido ou resistente contra a ação de corpos estranhos, microrganismos ou toxinas, através do sistema imune. A

resposta imunológica é caracterizada por dois mecanismos: natural (inata) ou adquirida (adaptativa) (Kaur *et al*, 2019).

### **1.3.1 - Imunidade inata**

A imunidade inata é aquela que não é adquirida através de contato com o antígeno. Ela é inespecífica e inclui: barreiras aos agentes infecciosos, citocinas, quimiocinas, sistema complemento, bem como neutrófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK). Ela é ativada no início da primeira fase da infecção e varia entre os indivíduos, de acordo com a idade e a atividade metabólica ou hormonal (Grubbs *et al*, 2020).

O sistema complemento é uma cascata de reações entre proteases, que ocorre em consequência a alguns estímulos, dentre eles, a presença de microrganismos patogênicos. Ele faz parte do sistema imune inato, compreendendo proteínas solúveis, reguladores e receptores ligados à membrana (Varela *et al*, 2015). Sua ativação pode ocorrer através de três vias: via clássica, alternativa e via das lecitinas. Todas essas vias levam à clivagem da proteína central desse sistema, C3, em C3a e C3b. A proteína C3a é uma quimiocina e a C3b serve como uma opsonina. Além disso, a C3b liga-se à C3 convertase, formando a C5 convertase. A C-5 convertase irá clivar a C5, iniciando a via terminal, que gera um complexo multimérico denominado complexo de ataque à membrana (MAC) C5b-C9, que pode causar a lise das células. Assim, as três funções principais desse sistema são: opsonização, quimiotaxia e lise (Lubbers *et al*, 2017).

### **1.3.2 - Imunidade adaptativa**

A imunidade adaptativa surge após exposição ao agente infeccioso, é específica e mediada por anticorpos, através das células linfóides (linfócitos B). Neste caso, o hospedeiro produz anticorpos e as células linfóides adquirem a capacidade de reagir a antígenos. A vantagem da imunidade adquirida é a resistência a longo prazo (Grubbs *et al*, 2020).

A ponte entre essas duas respostas é realizada por células apresentadoras de antígenos (APC), nomeadamente os macrófagos (MØ), neutrófilos e linfócitos B, que fazem essa apresentação de antígenos aos linfócitos T. As APC captam e processam o antígeno, ligando-o a uma molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II. Este complexo MHC II -antígeno migrará para a membrana celular, expondo o

antígeno ao complexo receptor de células T (TCR), localizado na superfície das membranas dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. As células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) ativadas transformam seu comportamento para um padrão de resposta Th1 ou Th2, cada um deles com um perfil de liberação de citocinas específico. O padrão Th1 produz citocinas relacionadas com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares: interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os linfócitos T que seguem o padrão Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estimulam uma resposta humoral, e consequentemente, a produção de anticorpos (Grubbs *et al*, 2020).

As APCs, também apresentam antígenos aos linfócitos T citotóxicos (TCD8<sup>+</sup>). Ao expressarem em sua superfície, moléculas do MHC I ligadas ao antígeno de *Leishmania*, estimulam os linfócitos T citotóxicos à destruição das células infectadas e controle do crescimento do número de parasitas (Christensen *et al*, 2019).

A disseminação e persistência dos parasitas do gênero *Leishmania* depende das estratégias que dispõem para modularem e subverterem a resposta imune inata e adaptativa dos hospedeiros imunocompetentes (Gabriel *et al*, 2019).

#### 1.4 - Os macrófagos e seus fenótipos

Os M $\emptyset$  são células provenientes do sistema mielóide hematopoiético, tendo o monócito como seu precursor. São células fagocitárias, com capacidade para apresentarem antígenos e secretarem muitas citocinas, fatores de crescimento e proteínas de fase aguda.

Eles são capazes de alterar seu fenótipo em resposta a estímulos diferentes, sendo classificados em M $\emptyset$  ativados classicamente (M1) e M $\emptyset$  ativados alternativamente (M2). O perfil M1 é pró-inflamatório e benéfico para a eliminação de agentes patogênicos e células tumorais, mas é prejudicial para o processo de cicatrização de feridas. O perfil M2 é anti-inflamatório, auxiliando na cicatrização e reparo dos tecidos. Embora esses perfis sejam bem descritos e definidos, existe um continuum de fenótipos intermediários entre esses dois polos (Funes *et al*, 2018).

As citocinas são essenciais na modulação do fenótipo dos M $\emptyset$ . A estimulação de M $\emptyset$  através de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , padrões associados a patógenos celulares (PAMPs), tais como lipopolissacárides ou sinais de perigo endógeno, leva à diferenciação para o fenótipo M1 (Zhang *et al*, 2008). Esse fenótipo tem um comportamento citotóxico, pois

essas citocinas induzem a expressão da óxido-nítrico-sintetase 2 (NOS2), que degrada arginina em OH-arginina, com outras reações sequenciais que culminam com a produção de óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas do oxigênio (ROS). Além disso, os MØ desse perfil produzem interleucina (IL) 1- $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ . Já o fenótipo M2, que apresenta um perfil anti-inflamatório, é consequente a ativação da chamada via alternativa, estimulada por IL-1, IL-4 e IL-13. Esse perfil produz fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de expressar a arginase, com consequente produção de ureia e ornitina, pela via da arginina. O efeito esperado dessa via é a proliferação celular, produção de colágeno e reparo tecidual (Funes *et al*, 2018; Gabriel *et al*, 2019).

Os monócitos/MØ exercem um papel fundamental nas infecções por *Leishmania*, uma vez que esta célula é a célula hospedeira final do parasita.

### 1.5 – Evasão da resposta imune na leishmaniose tegumentar

Após a transmissão das formas promastigotas de *Leishmania* pela picada do vetor, MØ e neutrófilos polimorfonucleares (PMN) do hospedeiro vertebrado migram rapidamente para a área do inóculo dos parasitas, na derme. Moléculas de proteofosfoglicanos (PPGs) são secretadas pela *Leishmania*, ainda no intestino médio do flebotomíneo. Esses PPGs, quando inoculados durante o repasto sanguíneo do vetor, estimulam o recrutamento dos MØ (Podinovskaia *et al*, 2015).

Ao mesmo tempo, a presença desse parasita no interior dos neutrófilos ativa o sistema complemento, e entra em ação o primeiro mecanismo de evasão ao sistema imune: a metaloproteinase gp63, um antígeno de superfície da *Leishmania*, se liga à molécula C3b, e esta é inativada (iC3b). Isso inibe as demais fases da cascata de reações desse sistema, impedindo a formação do MAC. Essa molécula iC3b permanece aderida à superfície da membrana, funcionando como opsonina que desencadeia a fagocitose do parasita pelo macrófago, célula hospedeira definitiva (Santos-Mateus *et al*, 2015).

Os PMN, ao fagocitarem o parasita, têm potencial para combatê-lo, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), exocitose do conteúdo de seus grânulos, que são ricos em proteases e formação de estruturas semelhantes a uma rede (NET – *neutrophil extracellular traps*) no espaço extra-celular, que imobilizam e inativam os parasitas. Entretanto, os parasitas do gênero *Leishmania* possuem mecanismos que

contornam essa resposta do hospedeiro, mantendo-se vivos dentro dos PMN, até que estas células, durante o processo de morte celular, são fagocitadas pelos MØ, mecanismo conhecido como eferocitose (revisto por Gabriel *et al*, 2019). Dessa forma, os MØ, células hospedeiras definitivas dos parasitas do gênero *Leishmania*, tornam-se infectados por fagocitose direta do parasita ou pelo chamado mecanismo de “cavalo de tróia”, através da absorção de formas amastigotas mantidas vivas no interior de neutrófilos com marcadores apoptóticos, fagocitados pelos MØ (Chaves *et al*, 2020).

Dentro dos fagolisossomas dos MØ, a forma promastigota da *Leishmania* se diferencia na forma amastigota, uma forma pequena, arredondada e imóvel, capaz de resistir aos mecanismos de defesa intracelular. Essa forma intracelular é capaz de induzir a diferenciação dos MØ nos fenótipos I ou II. Nas formas cutâneas de leishmaniose, a diferenciação dos MØ para o fenótipo M1 não impede a progressão da doença, mesmo que este fenótipo esteja associado ao controle da infecção. É o caso da *L. amazonensis*, em que os MØ-M1, por alguma razão, não são capazes de incapacitar a forma amastigota (revisto por Santos-Mateus *et al*, 2016).

### **1.6 - Vesículas extracelulares no gênero *Leishmania***

“Vesículas extracelulares” (VEs) é um termo genérico, utilizado para denominar partículas naturalmente liberadas pelas células, compostas por parede com bicamada lipídica, incapazes de se replicarem, pois não apresentam um núcleo funcional. São recomendações para nomenclatura dessas vesículas: caracterizá-las pelo tamanho, como pequenas (menor que 200nm) ou médias/grandes (acima de 200nm); pela composição bioquímica (por exemplo, CD63<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>-VEs, no caso de células de mamíferos) ou descrições pela célula de origem ou pelas condições de liberação (microrganismos, hipóxia) (Théry *et al*, 2018).

O papel das VEs de parasitas do gênero *Leishmania* tem sido amplamente estudado, uma vez que, nos últimos anos, os resultados apontam para uma função imunomoduladora favorável à infecção. Em 2018, Pérez-Cabezas e colaboradores observaram que as VEs de *L. infantum* induziram ao recrutamento celular de neutrófilos e células dendríticas, com um perfil diferente do provocado pelos parasitas inteiros, pois as VEs provocaram um recrutamento menor de neutrófilos e maior de células dendríticas. Além disso, quando parasitas foram inoculados em camundongos, juntamente com as VEs, o processo infeccioso foi potencializado, em relação ao grupo controle, inoculado

somente com os parasitas inteiros. Esses resultados foram dose-dependente relativamente às VEs.

Em outro estudo, monócitos/MØ humanos foram estimulados, *in vitro*, com VEs extraídas de formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Foi observado um aumento da migração dessas células, aumento da produção de IL-10 e redução da produção de IL-18 (Castelli *et al*, 2019).

Em 2020, Nogueira e colaboradores demonstraram que VEs de *L. amazonensis* tinham papel imunomodulatório, induzindo a produção, por MØ murinos, de NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, via ativação de receptores de imunidade inata, *toll like-receptor* (TLR)4 e TLR2.

Vacinas à base de VEs vêm sendo estudadas para variadas enfermidades, como câncer, doenças infecciosas virais, bacterianas e parasitárias. Uma vacina baseada em VEs de *B. pertussis* conferiu proteção contra infecção pulmonar em camundongos, de forma mais eficaz do que as vacinas comerciais atuais contra coqueluche. VEs de *Staphylococcus aureus* foram modificadas para não apresentarem toxicidade e mostraram efeitos imunogênicos, além de protegerem camundongos contra sepse letal causada por este microrganismo (Santos *et al*, 2021). Em uma publicação recente, envolvendo modelo experimental de imunização em leishmaniose tegumentar, as VEs de *L. amazonensis* foram apontadas como possíveis elementos de imunização ativa, conferindo proteção parcial e indução da polarização da resposta imune do hospedeiro para o perfil Th1, um perfil protetor (Dupin *et al*, 2021).

Estudos de proteoma de VEs de *Leishmania* spp. são escassos e em um deles foi demonstrado que a quantidade, morfologia, distribuição e carga proteica das VEs de *Leishmania infantum* estão alteradas em parasitos de cepas resistentes a fármacos, comparadas a cepas sensíveis (Douanne *et al*, 2020).

Estes estudos apontam a importância de investigação a respeito da interação entre as VEs e a resposta imune, uma vez que elas podem ser consideradas candidatas para desenvolvimento de vacinas, bem como tratamento das leishmanioses. Estudar o proteoma e a imunorreatividade de VEs explora a contribuição das alterações relacionadas a fatores transcricionais na sobrevivência do parasita, durante o seu ciclo de vida, bem como a capacidade de proteínas contidas nestas estruturas contribuírem no processo de imunização do hospedeiro.

## 2- Objetivos

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito das VEs de formas promastigotas de *L. amazonensis* na ativação de macrófagos murinos e analisar a imunogenicidade das proteínas das VEs, com os seguintes objetivos específicos:

2.1 - Isolar VEs de *L. amazonensis*, caracterizar seu tamanho e densidade e visualizar a vesiculação por microscopia eletrônica;

2.2 - Analisar o efeito das VEs de *L. amazonensis* na indução do perfil dos macrófagos de camundongos, através de:

2.2.1 - Quantificação da produção de ureia, caracterizando o perfil anti-inflamatório M2;

2.2.2 - Determinação da frequência de produção de IL-1 $\beta$ , caracterizando o perfil pró-inflamatório M1.

2.3 - Analisar o efeito das VEs na apresentação antigênica de macrófagos de camundongos, através de indicadores indiretos:

2.3.1 - Determinação da frequência de expressão de moléculas de superfície MHC I e MHC II, indícios de resposta de apresentação antigênica às células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente.

2.4 - Identificar o perfil proteico das VEs, utilizando eletroforese de proteínas;

2.5 - Analisar a antigenicidade das VEs por meio de reações específicas com soro humano de portadores de LTA e soro de camundongos infectados por *L. amazonensis*.

### 3 - Materiais e métodos

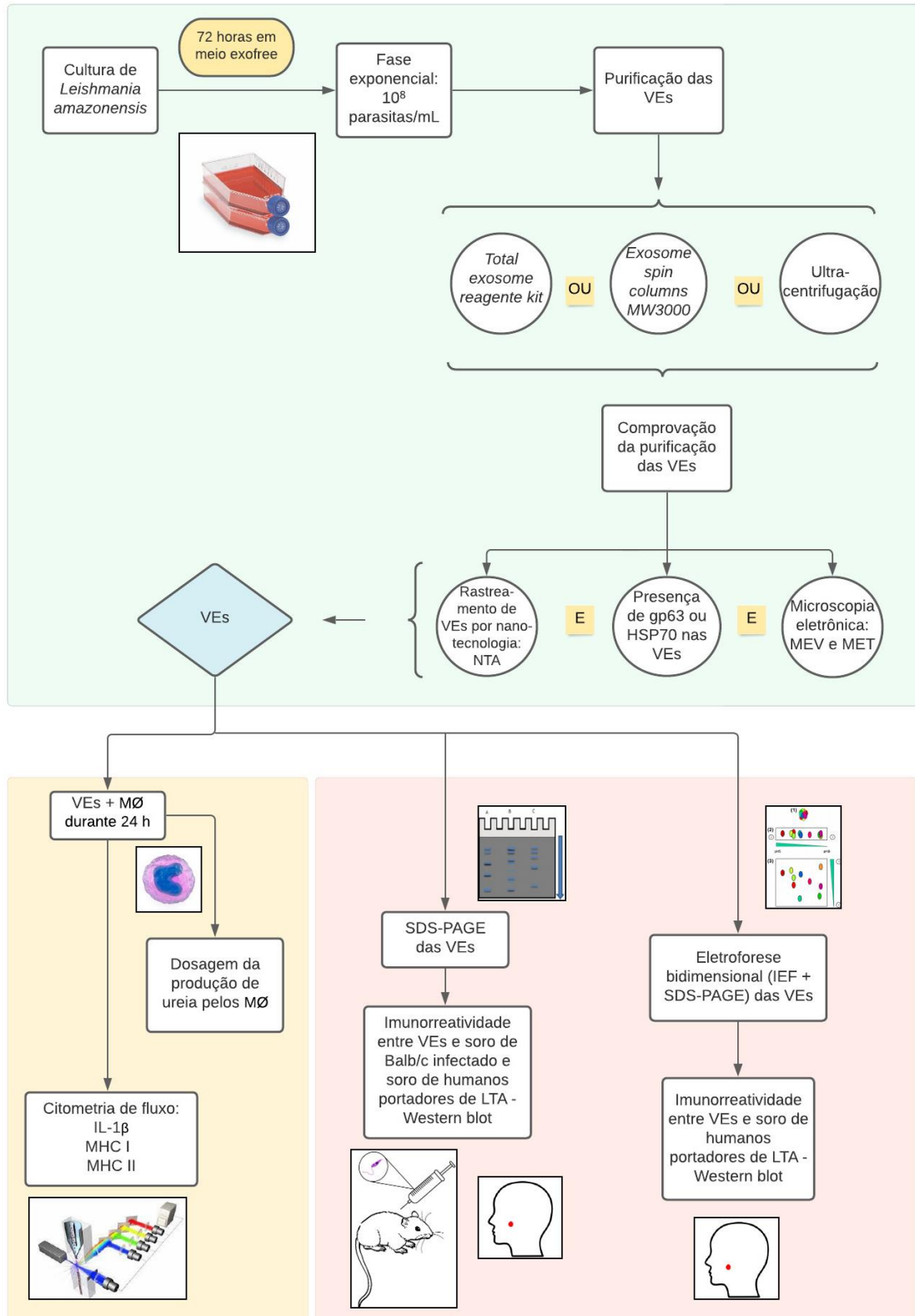
Os estudos foram realizados, inicialmente, no Laboratório de Imunologia Parasitária e Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa, em Lisboa, Portugal e, posteriormente, no Laboratório de Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, Brasil.

#### 3.1 – Desenho experimental

O estudo experimental foi constituído por três etapas (Fig. 1). Na primeira, vesículas extracelulares (VEs) de culturas axênicas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram purificadas por três métodos: kit comercial de reagente de extração de exossomas (*Total Exosome Isolation Reagent - from cell culture media* - Invitrogen), colunas de seleção de nanovesículas (*Exosome spin columns* - MW3000, Invitrogen) ou ultracentrifugação de sobrenadante de cultura. A escolha do método de extração dependeu da disponibilidade dos laboratórios, pois os três métodos são capazes de obter VEs com qualidade. A purificação de VEs foi comprovada pelo rastreamento por nanotecnologia (NTA), presença de glicoproteína de 63kDa (gp63) e *heat shock protein* de 70 kDa (HSP70) por imunorreação, microscopia eletrônica de varrimento (MEV) e de transmissão (MET).

Na segunda etapa foi analisado o efeito das VEs na modulação da atividade dos MØ, através da quantificação da produção de ureia por testes colorimétricos e produção de IL-1 $\beta$  utilizando a citometria de fluxo como ferramenta. A atividade dos MØ como células apresentadoras de antígeno (APC) foi avaliada indiretamente, através da expressão de moléculas de classe I (MHC I) e de classe II (MHC II) do complexo maior de histocompatibilidade, por citometria de fluxo.

A terceira etapa consistiu na análise do perfil e imunorreatividade das proteínas das VEs. Com a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e eletroforese bidimensional, foi avaliado o perfil de bandas e *spots* proteicos. A imunorreatividade foi avaliada por *Western-blot* das proteínas, utilizando soro de camundongos infectados por *L. amazonensis* e soro de humanos portadores de LTA.



**Figura 1 - Esquema representativo da sequência do trabalho experimental.** A etapa 1 (verde) refere-se à purificação de VEs e respectiva comprovação. A etapa 2 (laranja) avaliou o efeito das VEs na modulação dos MØ. A etapa 3 (rosa) consistiu no estudo da composição e imunorreatividade das VEs utilizando soro de humanos portadores de LTA e de camundongos infectados por *L.amazonensis*.

### 3.2 – Animais e Parasitas

Neste estudo foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* e protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*.

#### 3.2.1 – Camundongos

Os experimentos realizados em camundongos foram executados no (ICB), em Belo Horizonte (Brasil).

Foram utilizados 13 animais, entre machos e fêmeas, pertencentes à estirpe BALB/c, com idade de seis semanas. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UFMG. Foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB, sob condições ambientais, climáticas e de nutrição adequadas, conforme os requerimentos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA – regulamentado pela Lei Arouca 11.794, de 08/10/2008, da Constituição Federal Brasileira.

#### 3.2.2 – Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* são cultivadas em meio líquido (meio de Schneider, M199 ou RPMI, suplementados com 10% de soro fetal bovino), em condições axénicas.

A estirpe de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), utilizada para análise da interação das VEs com os MØ, foi gentilmente cedida pelo Prof. Doutor. Luiz Felipe Passero, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil. Esta estirpe foi isolada de um paciente com LTA, no estado do Pará, Brasil. Os parasitas foram identificados através de anticorpos monoclonais e perfis de isoenzimas no Instituto Evandro Chagas, em Belém, estado do Pará, Brasil (Yamamoto *et al*, 2013). As formas promastigotas desta estirpe foram mantidas em meio de cultura Schneider (*Cell culture media, Schneider's Drosophila Medium, VWR™*) ou em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute - HyClone RPMI 1640 media, Cytiva*), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor (56°C durante 30 minutos), e penicilina/estreptomicina a 1% (Pen Strep, 10.000 UI penicilina/mL e 10mg estreptomicina/mL – Sigma- Aldrich), e incubado em estufa refrigerada a 24°C. O meio de cultura foi escolhido conforme a disponibilidade no laboratório, pois os parasitas replicam-se bem em ambos.

Para os estudos de imunorreatividade e análise proteômica foram utilizadas as estirpes MHOM/BR/1987/BA125 e MHOM/BR/1989/BA336. Estas estirpes foram gentilmente cedidas pela Prof. Doutora Valéria Borges do Instituto Gonçalo Muniz/FIOCRUZ Bahia e pelo Dr. Rodrigo P. Soares do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas. A estirpe BA125 foi isolada de um paciente com LTA em 1987 a BA336 foi isolada de um paciente com leishmaniose tegumentar difusa em 1989.

As formas promastigotas dessas duas últimas estirpes foram cultivadas em meio M199 (*Medium 199, Earle's Salts, Gibco*<sup>TM</sup>) suplementado com 10% de FBS inativado pelo calor (56°C durante 30 minutos) e 1% de penicilina e estreptomicina (Pen Strep, 10.000 UI penicilina/mL e 10mg estreptomicina/mL – Sigma-Aldrich), em incubadora a 24°C.

### 3.3 - Macrófagos

A linha celular macrófago-*like* de murganho (P388D1) foi cultivada em meio RPMI 1640, previamente aquecido a 37°C. O meio foi suplementado com 10% de FBS livre de exossomas (FBS *exofree* – Thermo Fischer Scientific) inativado e 1% de PenStrep. Os MØ foram cultivados em suspensão, a 37°C, em atmosfera humida com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois ou três dias, foi adicionado meio fresco, mantendo uma concentração média de  $1 \times 10^6$  MØ/mL.

### 3.4 - Purificação das vesículas extracelulares (VEs) de *Leishmania amazonensis*

As VEs de *L. amazonensis* foram purificadas a partir do sobrenadante de culturas. Para efetuar a purificação das VEs, os promastigotas foram mantidos durante 72 horas em meio livre de exossomas. O período que decorre entre o repique das culturas e a extração das VEs foi denominado “período de vesiculação”.

Para iniciar este período, as culturas das promastigotas, em fase estacionária de crescimento, foram submetidas a centrifugação a 1800g, por 10 minutos, a 24°C. O *pellet* contendo os parasitas foi lavado em PBS estéril por duas vezes, nas mesmas condições de centrifugação, a fim de retirar o meio de cultura anteriormente utilizado, que possuía exossomas provenientes do FBS. O *pellet* foi ressuspensionado no meio de cultura (Schneider, RPMI ou M199), suplementado com FBS depletado de exossomas (FBS *exofree*), além da PenStrep.

No início e no final do período de vesiculação, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer, e a purificação das VEs somente foi realizada a partir de culturas com pelo menos  $2 \times 10^7$  parasitas/mL. A viabilidade dos parasitas foi calculada com o teste do azul de Tripán.

Para recuperação do sobrenadante, as culturas foram centrifugadas a 1000g, durante 15 minutos, a 24°C. As vesículas foram, então, purificadas por um dos três métodos: (i) kit de purificação através de colunas; (ii) kit de purificação através de reagente comercial de isolamento e (iii) purificação por ultracentrifugação. Ao final de cada purificação, a concentração de proteínas do extrato foi doseada, a fim de determinar o rendimento do método.

Os dois primeiros métodos foram utilizados no laboratório do IHMT (Lisboa). O método inicial de escolha foi o kit de colunas. Entretanto, como a dosagem de proteínas não atingiu o rendimento esperado na terceira purificação, optou-se por utilizar o kit de reagente comercial de isolamento, que apresentou maior rendimento. A ultracentrifugação foi o método de escolha utilizado quando o estudo foi realizado no ICB (Belo Horizonte), devido ao longo prazo previsto para a entrega do kit de reagente comercial.

### **3.4.1 – Purificação de VEs através de kit comercial de colunas**

Para a análise da interação VEs-MØ, foram utilizadas VEs libertadas pela estirpe M2269, purificadas através do kit *Exosome spin columns* (MW3000), conforme manual do fabricante (Invitrogen). Este kit possui microtubos de 1,5mL com colunas em seu interior que, depois de hidratadas, formam um gel. A adição da suspensão de VEs a estes microtubos, seguida de centrifugação a 750g por dois minutos, induz a solução a passar pela coluna de gel. O produto final eluído contém somente partículas inferiores de 200nm. Após a purificação, as VEs foram doseadas através da concentração proteica determinada no Espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) e respectivo *Software*. A solução final de VEs foi conservada a -20°C até à sua utilização.

### **3.4.2 – Purificação de VEs através do reagente comercial *Total Exosome Isolation***

O reagente do kit *Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)* (Invitrogen), liga-se às moléculas de água, forçando os componentes menos solúveis,

como as vesículas, a saírem da solução. As VEs precipitadas são recuperadas após centrifugação.

O reagente foi adicionado à suspensão final de VEs obtida a partir dos sobrenadantes das culturas de *L. amazonensis*, na proporção de 0,5 mL de reagente por cada mL de suspensão. Após homogeneização, esta solução foi deixada em repouso a 4°C durante cerca de 8h. Passado este período, a solução foi centrifugada a 10000 g, durante 60 minutos, a 4°C. As VEs ficaram retidas no *pellet*, que foi ressuspensionado em tampão PBS 1×, estéril. A concentração proteica das VEs purificadas foi doseada através do método de Bradford. O método de Bradford se baseia na interação entre o corante Comassie Blue G250 e as proteínas. Essa interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm (Zaia *et al*, 1998). Resumidamente, em placa de 96 poços foram colocados, em duplicata, H<sub>2</sub>O, diluições seriadas de albumina sérica bovina (BSA) e as amostras estudadas. Aos poços foi acrescentado o reagente de Bradford e efetuado a leitura em leitor de ELISA (*Multiskan GO*, Thermo Scientific) a 595nm. Após estabelecer a curva padrão, utilizando a absorbância das diluições seriadas de BSA, foi efetuada a regressão linear e, com a equação da reta foram calculadas as concentrações das amostras. A solução final foi armazenada a -20°C, até o momento do uso.

A purificação das VEs através do uso do reagente comercial de concentração de exossomas foi um dos métodos de purificação utilizado para obtenção das VEs da estirpe M2269. Estas VEs foram utilizadas na análise de imunorreatividade aos soros de camundongos infectados por *L. amazonensis* e soros de humanos portadores de LTA.

### 3.4.3 – Purificação de VEs por ultracentrifugação

A purificação das VEs produzidas pelas estirpes BA125 e BA336 foi realizada através da técnica de ultracentrifugação. Após o período de 72 horas de vesiculação em meio exofree, o sobrenadante de cultura de *L. amazonensis* foi filtrado com filtros estéreis de 0,22µm. Esta suspensão de VEs foi submetida a cinco centrifugações seriadas em ultracentrífuga (Sorvall® Ultra Pro 80): (i) 500 g durante 10 minutos, a 4°C; (ii) 1500g por 10 minutos a 4°C; (iii) 10000g por 10 minutos a 4°C e (iv) 100000g, por duas horas, a 4°C. Os *pellets* foram ressuspensionados em meio M199 sem soro e as proteínas doseadas pelo método de Bradford ou pelo fluorímetro Qubit® 4 (Thermo Fisher Scientific).

### **3.5 – Análise e caracterização das VEs de *L. amazonensis***

#### **3.5.1 - Análise das VEs por rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA)**

O equipamento utilizado para efetuar a análise NTA das VEs foi o *NanoSight NS3000* (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido), equipado com uma câmera CCD e laser de 405 nm. As frações foram diluídas (1:100) em PBS 1×. Cada amostra foi capturada em triplicado por 30 segundos e o nível da câmera foi definido em 14. A análise foi realizada em colaboração com o Doutor Rodrigo Pedro Soares (Instituto René Rachou/FIOCRUZ), na Escola Paulista de Medicina, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O *Software* utilizado na análise foi o NTA 2.3.

Este equipamento utiliza feixes de laser, que permite que as VEs sejam visualizadas por luz espelhada. Esta luz é focada por um microscópio com câmera de vídeo que registra o movimento dessas partículas. O *software* rastreia este movimento aleatório, chamado movimento Browniano, e assim determina o coeficiente de difusão das partículas. Este coeficiente é utilizado no cálculo do tamanho das partículas (Comfort *et al*, 2021). Além do tamanho, o equipamento estima a concentração das partículas na suspensão. As capturas foram feitas em triplicata.

#### **3.5.2– Microscopia eletrônica de varrimento das VEs**

O microscópio eletrônico de varrimento (MEV) é um aparelho que fornece imagens de alta resolução, com informações sobre aspectos topográficos de uma amostra, identificando partículas até 1 nm. Tal equipamento consegue fornecer uma aparência tridimensional da imagem das VEs. Além disso, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica. O princípio de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está sincronizada com o feixe incidente. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra (Dedavid *et al*, 2007).

As formas promastigotas da estirpe M2269 de *L. amazonensis*, fixadas no período de vesiculação, foram analisadas em colaboração com a Prof. Doutora Graça-Alexandre Pires (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal). Os

parasitas das estirpes BA125 e BA336 foram analisados no Centro de Microscopia (CEM) da UFMG (Belo Horizonte, Brasil).

Para obtenção das imagens, os parasitas foram colocados em meios de cultura *exofree*, e após 72 horas de vesiculação, a cultura foi centrifugada. O *pellet* obtido foi ressuspenso em solução tampão de cacodilato de sódio com glutaraldeído a 2,5%, numa proporção de 1:1 (*pellet*:solução). Essa solução é responsável pela fixação dos parasitas, mantendo as vesículas que estão sendo liberadas, na superfície celular.

As lamínulas estéreis, onde são colocadas as soluções contendo os parasitas fixados, foram previamente distribuídas em placas de 24 poços, e tratadas com solução de polilisina 1%. Este tratamento consistiu em preencher os poços com 400µL da solução de polilisina durante uma hora e, a seguir, o excesso desta solução foi retirado. A placa foi deixada secar durante a noite, a 37<sup>0</sup>C. A polilisina auxilia na fixação dos parasitas e das VEs à superfície das lamínulas. As etapas seguintes de preparo para a microscopia eletrônica de varrimento (desidratação e metalização) foram realizadas nos centros especializados em microscopia.

### **3.5.3 – Microscopia eletrônica de transmissão das VEs**

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) utiliza um feixe de elétrons emitidos em uma partícula ultrafina. Enquanto passam pela amostra, os elétrons interagem com a mesma, formando uma imagem, que é detectada por um sensor. Neste trabalho, a MET foi realizada em colaboração com o Prof. Doutor Rodrigo Pedro Soares. As imagens foram adquiridas a 120kV em microscópio eletrônico Tecnai G2, no Laboratório de Ultraestrutura Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP/USP – Brasil.

Para obtenção das imagens da MET, foram enviadas ao centro de microscopia eletrônica, amostras das VEs das estirpes BA125 e BA336. Foi analisado um *pool* de três lotes biológicos diferentes das VEs destas estirpes.

### **3.5.4 – Presença de proteínas marcadoras de VEs: gp63 e HSP70**

#### **3.5.4.1 - Dot-blot para identificação de gp63 nos extratos de VEs**

O dot-blot é uma técnica que permite identificar a presença de proteínas através de imunorreação. É realizado através da aplicação direta do extrato proteico estudado

numa membrana de nitrocelulose, seguido de bloqueio da membrana para evitar ligações inespecíficas. A seguir são realizadas as incubações em soluções com anticorpos primários seguido de um anticorpo de detecção (anticorpo secundário conjugado com uma molécula de detecção). São realizadas lavagens da membrana entre estas incubações, para eliminar os anticorpos não ligados. Usualmente a leitura é realizada em aparelhos de identificação de quimioluminescência e o resultado é positivo se houver uma imagem circular de cor escura, representando as proteínas reativas aos anticorpos aderidas à membrana.

A membrana de nitrocelulose foi sensibilizada diretamente com o volume equivalente a 5µg de proteínas de VEs. Esse experimento foi realizado em triplicata experimental e biológica. Após secagem durante 8h a 4°C, as membranas foram imersas em solução de bloqueio (PBS + leite em pó 5%) durante 2 h a temperatura ambiente. Após uma rápida lavagem com água destilada, as membranas foram incubadas por uma hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo primário anti-gp63 de *Leishmania* (*Anti-Leishmania Major Surface Protease (gp63) Monoclonal Antibody* – Cedarlane®), diluídos em solução de bloqueio a 1:500. Após três lavagens de cinco minutos, sob agitação leve, em solução de lavagem (Tween20 a 0,5% em PBS 1×), as membranas foram incubadas, durante uma hora, com o anticorpo secundário anti-mouse (*Anti-Mouse IgG - whole molecule -Peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich*), conjugado com peroxidase e diluído em solução de bloqueio a 1:500, a temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas três vezes e imersas em PBS por cinco minutos, até a revelação das imagens com o kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) e a imagem do resultado foi capturada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS 500, da GE Healthcare Bio-Sciences AB.

#### **3.5.4.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE) e Western blot para identificação de HSP70 nas VEs**

Para identificar a presença de HSP70 nas VEs, foi realizado SDS-PAGE seguido de Western Blot.

Western-blot é uma técnica utilizada para pesquisa e/ou identificação de proteínas. Ela é precedida pela realização do SDS-PAGE, com o intuito da separação das proteínas

em bandas, de acordo com sua massa molecular. Através da aplicação de corrente elétrica as proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (*blotting*), mantendo a mesma posição que ocupavam no gel. A membrana é de seguida bloqueada para evitar ligações inespecíficas e incubada com anticorpos primários seguido de um anticorpo de detecção (anticorpo secundário conjugado a uma molécula de detecção). São realizadas lavagens da membrana entre as incubações, para retirar anticorpos não ligados. Para a revelação, adiciona-se, à superfície da membrana, um agente quimioluminescente que reage com a peroxidase conjugada ao anticorpo secundário, emitindo uma luz que é captada por um aparelho de identificação de quimioluminescência. O resultado positivo é uma imagem linear, de banda de cor escura, representando as proteínas reativas ao anticorpo aderidas à membrana (Mahmood *et al*, 2012).

Para separação das frações proteicas das VEs foi realizado SDS-PAGE em mini-géis, preparados a 12% (acrilamida 30%, Tris 1,5M, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED 1:3750), com gel de empilhamento (*stack*) de 4% (acrilamida 30%, Tris 1M, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED 1:1000). A espessura dos géis era de 1mm. Para cada canaleta do gel, foi preparada uma solução de 20µg de VEs em tampão de amostra 2× (Tris/HCl pH 6,8 100mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%), na proporção de 1µL de amostra para 1µL de tampão. Esta solução foi previamente aquecida a 95°C em termobloco, durante cinco minutos, antes de sua aplicação no mini-gel. As amostras de VEs foram colocadas nas canaletas em triplicado. O controle positivo foi 10µg de extrato de HSP70 recombinante, e o controle negativo foi meio de cultura puro em FBS 10%. Em cada gel foi colocado um padrão de massa molecular pré-corado (BioRad), para fins de transferência para membrana. Para a eletroforese das proteínas foi aplicada uma corrente de 60V e 50mA nos primeiros 20 minutos, seguido de aumento da voltagem para 120V, mantendo a amperagem.

Após a confecção do mini-gel, a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada num *Semi Dry Blotter TE 77 PWR* (Amersham Biosciences), a 1.6 mA/cm<sup>2</sup>, em 45 minutos. Após o bloqueio (PBS + leite em pó 5%) por uma hora, a membrana foi lavada rapidamente com água destilada e incubada em soro de coelho anti-HSP70 (1:1500), diluído em solução de bloqueio, durante 8 horas a 4°C. Após três lavagens a membrana foi incubada em anticorpo secundário anti-coelho (*Goat Anti-rabbit IgG antibody, HRP conjugate* – Sigma-Aldrich), diluído a 1:300, conjugado com peroxidase, durante uma hora e meia, a temperatura ambiente. A reação de quimioluminescência foi realizada com o kit comercial ECL (*enhanced*

*chemiluminescence*) da ThermoFisher e captada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS500.

O cálculo da massa molecular das bandas reagentes, para análise dos resultados, foi feito conforme as orientações do fabricante do padrão de massa molecular (Bio-Rad). Resumidamente, obtém-se a curva traçando o logaritmo das massas moleculares do padrão utilizado *versus* a mobilidade relativa (Rf) de cada proteína do padrão. A Rf é calculada pela razão entre a distância de migração da proteína pela distância total de migração do corante (em centímetros). A curva pode ser utilizada para o cálculo da massa molecular de proteínas desconhecidas.

### **3.6 - Preparação do extrato de antígenos totais de promastigotas de *L. amazonensis***

Para o preparo do extrato de antígenos totais, os parasitas foram distribuídos em tubos com igual volume de cultura e centrifugados a 1800g, durante 15 minutos, a 4°C. Os *pellets* foram ressuspensos em PBS 1× estéril e lavados duas vezes. Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspensado em água destilada. As etapas seguintes consistiam em seis ciclos de congelamento e descongelamento a temperatura de -20°C e temperatura ambiente, respectivamente. No congelamento, a formação de cristais extracelulares e o rearranjo das estruturas intracelulares leva ao rompimento da membrana celular, mantendo a estrutura das proteínas. Após o último ciclo, foi realizada uma última centrifugação, para eliminar o material insolúvel. Uma alíquota foi retirada para medir a concentração de proteínas, no Espectrofotômetro NanoDrop™ 1000.

### **3.7 – Efeito das VEs na atividade de MØ murinos *in vitro***

Para analisar a influência das VEs de promastigotas de *L. amazonensis* na ativação dos MØ murinos, foram colocadas  $2 \times 10^5$  células por poço de uma microplaca de 96 poços num volume total de 200µL/poço. Os MØ foram estimulados com VEs em duas concentrações diferentes (7,09 µg/µL e 3,54 µg/µL), extrato total solúvel de antígenos de promastigotas de *L. amazonensis* (40 µg/mL) e expostos a promastigotas viáveis na proporção de três parasitas por MØ. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37°C, em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. Como controlo negativo foram incubados MØ em meio RPMI e Schneider. Essa necessidade de dois controlos negativos em meios de cultura diferentes deveu-se ao fato de as VEs estarem suspensas em meio Schneider e os

parasitas vivos em meio RPMI. Assim, a análise dos controlos negativos teve em consideração a eventual influência do meio de cultura nos resultados. Como controlo positivo foram utilizados MØ estimulados com phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 30µM). O PMA é utilizado para estimular a produção de citocinas e proliferação celular.

As experiências foram repetidas três vezes e cada condição experimental foi realizada em duplicata. Após as 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem da concentração de ureia por ensaio colorimétrico e as células recolhidas para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Para a análise dos dados dos resultados, foram aplicados os testes estatísticos *Wilcoxon signed-rank test* para amostras pareadas e ANOVA, para comparação entre mais de dois grupos. Os dados foram analisados e os testes aplicados utilizando o *software* Excel Office 2019, através do suplemento estatístico X-realstats (Microsoft).

### **3.7.1 – Produção de ureia *in vitro*, por MØ murinos estimulados por VEs de *L. amazonensis***

Os sobrenadantes dos MØ estimulados durante 24 h foram conservados a -20°C até serem utilizados. Para o doseamento da ureia produzida pelos MØ foi utilizado o kit QuantiChrom™ Urea Assay Kit (DIUR-100, BioAssay Systems) de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio tem duas etapas: a primeira consiste na reação de condensação do orto-ftaldeído (OPA) com a ureia e a segunda etapa envolve uma rápida reação com o difosfato de primaquina, sofrendo um rearranjo que culmina em um produto de cor intensa. A leitura é realizada em fluorímetro.

Numa microplaca de 96 poços, foi colocado 50 µL do meio RPMI e 50µL dos sobrenadantes das culturas de MØ em cada poço. Como padrão foi utilizado 50µL da solução padrão (5mg de ureia/dL) e como branco foi utilizado 50 µL de água (blank) ao qual foi adicionado meio RPMI. Preparam-se os reagentes A e B, na proporção 1:1. O reagente A contém 0,4% de ácido sulfúrico; 0,04% de *Brij* 35 e 10% de orto-ftaldeído. O reagente B contém 0,08% de difosfato de primaquina; 0,8% de ácido bórico; 22% de ácido sulfúrico e 0,04% de *Brij* 35. A cada poço foram adicionados 200µL da mistura dos reagentes A e B e a placa foi a incubar durante 50 minutos, à temperatura ambiente na ausência de luz. A leitura da densidade ótica foi realizada em fluorímetro (TRIAD™ 1065, DYNEX Technologies, EUA) com comprimento de onda de 430nm.

A partir dos resultados da densidade ótica (OD), a concentração de ureia foi calculada, utilizando a seguinte equação:

$$[Ureia] = [(OD_{amostra} - OD_{branco}) / (OD_{padrão} - OD_{branco})] \times n \times [Padrão] \text{ (mg/dL)}$$

onde,  $n$  é o fator de diluição das amostras, que será igual a 1, pois no nosso caso as amostras não foram diluídas e a [Padrão] é igual a 5. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de ureia nas amostras.

### 3.7.2 – Marcação das células com anticorpos monoclonais para citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de análise de células baseada no uso de raios *laser*, anticorpos monoclonais, fluorocromos, eletrônica e análise por *software* de computação. Esta técnica permite a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de diversos tipos celulares. As células estudadas devem ser previamente marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos, conforme a molécula de interesse. Dessa forma, quando as células passarem no aparelho e forem analisadas uma a uma, a luz do laser provoca uma excitação no fluorocromo e este emite um comprimento de onda de determinada cor, que é detectado por um sensor. Este sensor converte a luz captada em sinais eletrônicos, que são enviados ao computador e analisados através de um *software* específico. O resultado são informações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo, permitindo estimar a frequência de células positivas e a análise de complexidade e tamanho (Ferraz *et al*, 2013)

Os MØ foram recolhidos das microplacas, por aspiração simples, uma vez que eram não aderentes, e em seguida foram lavados com 500µL de PBS por centrifugação a 300g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Retirado o sobrenadante, as células foram fixadas em 200µL de paraformaldeído a 2%, durante 20 minutos, a 4°C, na ausência de luz, seguida por outra centrifugação, a 300g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar o paraformaldeído. A seguir, as células foram lavadas com 200µL de PBS acrescido de albumina 2%. Após centrifugação a 300g durante 10 minutos a 4°C, as células foram incubadas em 100µL do tampão de lavagem (PBS 1×, albumina 2% e Tween 20 a 0,5%) acrescido dos anticorpos monoclonais diretamente conjugados com fluorocromo. O tampão de lavagem possui um detergente (Tween 20) para permeabilização da membrana celular. Essa permeabilização permite a passagem dos anticorpos para a região intracelular, marcando moléculas intracelulares.

Os anticorpos monoclonais e seus respectivos alvos, além dos fluorocromos utilizados encontram-se descritos na tabela 3.1.

<b>Comprimento de onda do laser</b>	517	575	660
<b>Filtro de emissão</b>	525/40	585/42	660/10
<b>Fluorocromo conjugado</b>	FITc	PE	APC
<b>Biomarcador</b>	MHC Class I	MHC Class II	IL 1- $\beta$
<b>Espécie reativa</b>	Mouse	Mouse	Mouse
<b>Clone</b>	34-1-2S	M5/114.15.2	NJTEN3
<b>Volume</b>	1 $\mu$ g/amostra	0,02 $\mu$ g/amostra	0,06 $\mu$ g/amostra
<b>Fabricante</b>	eBioscience	eBioscience	eBioscience

**Tabela 3. 1– Citometria de fluxo.** Características do citômetro de fluxo utilizado (CitoFlex - Beckman Coulter) e dos conjugados usados para imunofenotipar MØ.

Os anticorpos não ligados foram retirados através de uma lavagem com PBS por centrifugação a 300g durante 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 200 $\mu$ L de tampão de PBS com albumina 2% e mantidas na ausência de luz, a 4°C, até serem analisadas por citometria de fluxo.

A leitura foi realizada no citômetro de fluxo de bancada CytoFLEX, (Beckman Coulter Life Sciences). Para ajustar a voltagem e fluorescência, assegurando a correta leitura das amostras, foram utilizadas amostras marcadas com um único fluorocromo, bem como uma amostra de células fixadas, mas sem marcação, como controle. Os resultados dos gráficos foram analisados com o programa FlowJo V10 (Tree Star Inc., USA).

### 3.8 – Análise da viabilidade dos MØ, através da redução de resazurina

O ensaio de redução de resazurina é utilizado para medir a viabilidade celular. Ele se baseia no princípio da adição de um indicador redox não fluorescente (resazurina) ao meio de cultura. Quando metabolizada pelas células viáveis, a resazurina é convertida em resorufina, uma forma altamente fluorescente. A dimensão desta conversão é um reflexo da viabilidade celular (Nakayama *et al*, 1997).

O teste de resazurina foi realizado em triplicata, após 24 horas de incubação dos MØ, numa concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço de uma microplaca de 96 poços num volume total de 200µL/poço. Os MØ foram estimulados com VEs em duas concentrações diferentes (7,09 µg/µL e 3,54 µg/µL), extrato total solúvel de antígenos de promastigotas de *L. amazonensis* (40 µg/mL) e expostos a promastigotas viáveis na proporção de 3 parasitas por MØ. As placas foram incubadas durante 24 horas, a 37<sup>0</sup>C, em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub>. Os controles positivos utilizados foram MØ em repouso, ou seja, MØ incubados em meio RPMI ou Schneider, e o controle negativo foi MØ incubados em meio contendo paraformaldeído a 2%.

O sal de resazurina foi dissolvido em hidróxido de amônio de forma que a solução *stock* tivesse uma molaridade de 3,9mM. A solução de trabalho consistia em PBS 1× com resazurina a uma concentração final de 0,033 µg/mL. Ao final das 24 horas, a cada poço foi acrescentado 25µL desta solução de trabalho. A leitura em fluorímetro foi realizada imediatamente após o acréscimo da solução e uma hora depois. A intensidade da fluorescência foi lida a 595 nm, após excitação a 535nm, no fluorímetro TRIAD™ 1065 (Dynerx Technologies, EUA) e analisados pelo *software* Concert™ – TRIAD™ versão 2.1.0.17. A análise dos dados foi feita por regressão linear e os gráficos e testes estatísticos realizados no Excel Office 2019 (Microsoft).

### 3.9 - Soros anti- *L. amazonensis* de camundongos BALB/c

Os camundongos foram divididos em dois grupos: 6 controles e 7 infectados. Os animais do grupo controle negativo, camundongos não infectados, foram mantidos nas mesmas condições de ambiente e alimentação que o outro grupo de camundongos infectados. Os animais do grupo infectado foram inoculados na região intraperitoneal com 10<sup>6</sup> promastigotas de *L. amazonensis*. Após oito semanas de infecção, foi coletado sangue da cauda de cada animal dos dois grupos. Essas amostras foram centrifugadas a 2000g, durante dois minutos, à temperatura ambiente. O soro foi utilizado para analisar a produção de anticorpos através de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) em amostras com diluição seriada (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16).

Para realizar o ELISA, foi feita a sensibilização de placas de 96 poços, com extrato de antígeno total de *L. amazonensis*. A solução de antígeno total foi adicionada a tampão de bicarbonato a um pH de 9,6, na concentração proteica de 1µg em 100µL, por poço. Essa solução foi deixada a 4<sup>0</sup>C durante a noite. Após este tempo, a placa foi lavada três

vezes com solução de lavagem (PBS 1× com Tween 20 a 0,05%). Em seguida foi adicionado solução de bloqueio (leite em pó desnatado diluído a 5% em PBS 1× com Tween 20 0,05%). Após uma hora de bloqueio, a 37<sup>0</sup>C, a placa foi lavada uma vez, estando em condições de ser utilizada.

O ELISA é um método baseado na reatividade de anticorpos específicos anti-*Leishmania* existentes no soro, com antígenos fixados em suporte plástico (placa de 96 poços). Este reconhecimento é revelado através de um segundo anticorpo conjugado com uma enzima (peroxidase), permitindo a visualização da reação quando é adicionado o substrato da enzima. A leitura foi realizada com filtro de 492nm, no aparelho Multiskan GO (Thermo Scientific), e análise dos resultados no *software* “Thermo Scientific SkanIt Software”.

Após confirmação da resposta adequada da produção de anticorpos pelo grupo de camundongos infectados, foi realizada a eutanásia, para obtenção de amostras de sangue total e posterior extração do soro. Os camundongos foram submetidos ao procedimento sob anestesia geral e foi retirado sangue do plexo braquial. O baço dos camundongos do grupo infectado foi retirado, para realização de *imprint* citológico, corado com eosina e Giemsa e visualização em microscópio óptico a fim de pesquisar formas amastigotas de *L. amazonensis*.

O sangue total foi centrifugado a 2000 g durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Foram separadas e identificadas alíquotas de 30 e 50 µL do soro de ambos os grupos de animais, e congelados a -80°C para uso posterior.

O soro dos dois grupos de animais foi analisado através de ELISA, em placas sensibilizadas com antígeno total de *L. amazonensis*, para a pesquisa de anticorpos, nas titulações de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. O *cutoff* considerado foi a média das absorbâncias do grupo não infectado (controle negativo), descontado o valor de absorbância do branco, acrescida de três vezes o desvio padrão.

### **3.10 – Soro de humanos portadores de leishmaniose tegumentar americana (LTA)**

Os soros de humanos utilizados para a pesquisa de imunorreatividade das VEs de *L. amazonensis* foram cedidos pelo Dr. Edward José Oliveira, pesquisador do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram utilizados 10 soros de indivíduos saudáveis (exclusão previamente realizada *in house* pelo ELISA rK39), como controle negativo, e 10 soros de pacientes diagnosticados com LTA (exame clínico e RIFI). Para realização dos experimentos,

foram feitos *pools* com 10µL do total de soros de cada grupo, totalizando 100µL por grupo (doentes e controle negativo).

### 3.11 – Caracterização das proteínas das VEs de *L. amazonensis* por SDS-PAGE e sua imunogenicidade

#### 3.11.1 - SDS-PAGE

Para visualização das frações proteicas das VEs, foi realizado SDS-PAGE em mini géis. Para cada canaleta do gel, foi preparado uma solução de 20µg de VEs em tampão de amostra 2×, na proporção de 1µL de amostra para 1µL de tampão. Esta solução foi aquecida a 95°C em termobloco, durante cinco minutos.

Os géis de eletroforese foram preparados a 12%, com gel de empilhamento (*stack*) de 4%. A espessura dos géis era de 1mm. As amostras de VEs foram colocadas nas canaletas em triplicado. O controle positivo foram amostras de 20µg de antígeno total de *L. amazonensis*, e o controle negativo foi meio de cultura puro em FBS 10%. Em cada gel foi colocado um padrão de massa molecular não corado (BioRad).

Para a eletroforese, foi aplicado uma corrente de 60V e 50mA nos primeiros 20 minutos, seguido de aumento da voltagem para 120V, mantendo a amperagem.

Após o término da corrida, que variava entre uma e uma hora e meia, os géis foram fixados com solução de ácido ortofosfórico 2% e etanol 30% (fixador 1), seguida de ácido fosfórico 2% (fixador 2) e ácido ortofosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 12% (fixador 3). A seguir, 0,1% de azul brilhante de Comassie G250 4% foi acrescentado à solução fixadora e mantido durante cinco dias. Após este período, o excesso de corante era retirado com solução descorante lenta (metanol 10% e ácido acético 5%).

O cálculo das massas moleculares (em kDa) das bandas proteicas foi realizado conforme as orientações do fabricante do padrão de massa molecular (Bio-Rad). Resumidamente, obtém-se a curva traçando o logaritmo das massas moleculares do padrão utilizado *versus* a mobilidade relativa (Rf) de cada proteína do padrão. A Rf é calculada pela razão entre a distância de migração da proteína pela distância total de migração do corante (em centímetros). A curva pode ser utilizada para o cálculo da massa molecular de frações proteicas desconhecidas.

### 3.11.2 – Western-blot

O estudo da imunogenicidade das VEs foi realizado com soro de camundongos infectados e em soro de humanos portadores de LTA. Após separação das frações proteicas das VEs em SDS-PAGE, foi efetuada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada num Semi Dry Blotter TE 77 PWR (Amersham Biosciences), a 1.6 mA/cm<sup>2</sup>, em 45 minutos.

A membrana foi cortada em tiras para separar os duplicados e deixada em solução de bloqueio (PBS + leite em pó 5%) durante uma hora. Em seguida, lavada rapidamente com água destilada.

Para a análise da imunorreatividade das VEs ao soro dos camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, cada metade da membrana de nitrocelulose foi identificada e incubada, separadamente, em soro de camundongo infectado (1:100) e soro de camundongo não infectado (controle negativo), na mesma diluição. As membranas foram deixadas a incubar durante cerca de 8h a 4°C. Em seguida foram lavadas e incubadas em solução contendo o anticorpo secundário (*Anti-Mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in rabbit*, Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase, na concentração de 1:500, durante uma hora.

Para a análise da imunorreatividade das VEs ao soro de humanos portadores de LTA, foi realizado procedimento idêntico. A membrana foi dividida em duas, identificadas e incubadas, separadamente, em soro de humano portador de LTA (1:100) e soro de humanos saudáveis (controle negativo), na mesma diluição. Após incubação durante 8h a 4°C, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (*Goat Anti-Human IgG Antibody, HRP conjugate*, Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase, na concentração de 1:5000, durante uma hora e meia.

Após lavagem e incubação das membranas em PBS, por cinco minutos, foi realizada a revelação com o kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, da Thermo Fisher Scientific e imagem do resultado foi capturada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS 500, da GE Healthcare Bio-Sciences AB.

Para o cálculo da massa molecular das bandas reativas nos testes de Western-blot, foram seguidas as orientações do fabricante do padrão de massa molecular pré-corado (Bio-Rad).

### 3.12 – Eletroforese bidimensional (2-DE) das proteínas das VEs

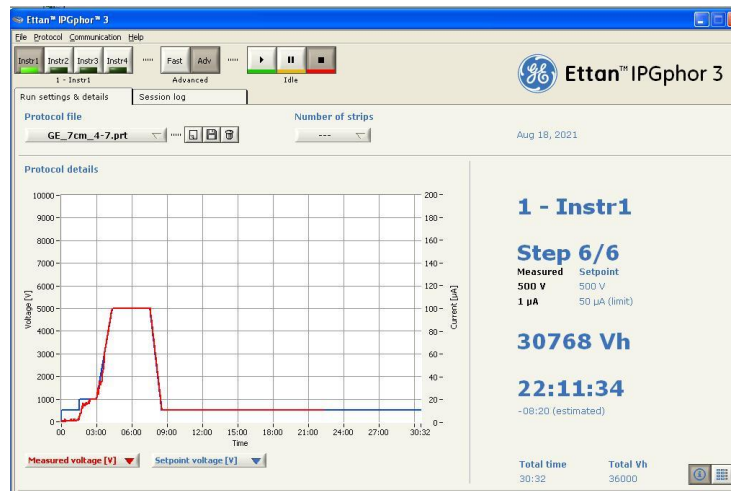
A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma técnica utilizada para separação de proteínas de uma determinada amostra, considerando duas dimensões: o ponto isoelétrico da proteína e sua massa molecular. Durante a primeira dimensão, denominada focalização isoelétrica (IEF), as proteínas são separadas em uma tira fina de gel de poliacrilamida (*strip*) com um gradiente de pH. Através da aplicação de uma corrente elétrica, as proteínas migram ao longo deste gel, até encontrarem uma faixa de pH referente ao seu ponto isoelétrico, onde ficam com carga total neutra, interrompendo a migração no gel. Na segunda dimensão, essas proteínas separadas na IEF são submetidas a uma eletroforese convencional em gel de poliacrilamida e SDS, migrando ao longo do gel de acordo com sua massa molecular. Como esses parâmetros de ponto isoelétrico e massa molecular são independentes, o resultado é uma separação mais específica das proteínas e com grande resolução, formando pontos (*spots*) de proteínas que, quando corados com Comassie Blue G250 ficam visíveis (Júnior *et al*, 2013).

Foi realizada a eletroforese 2-DE com VEs das cepas BA125 e BA336 de *L. amazonensis*. Para cada estirpe, foram utilizadas tiras de gel comerciais (*strips*), de 7cm de comprimento, com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 4 a 7 (Immobiline™ DryStrip – Cytiva). As *strips* de 7cm foram hidratadas, durante 12 horas a temperatura ambiente, com 190µg de proteína em tampão IEF (Ureia 8M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, azul de bromofenol 0,0025%) num volume final de 125µL. A seguir, as tiras foram colocadas no equipamento Ettan™IPGPhor™3 (GE-Healthcare) para IEF, com uma corrente elétrica máxima de 50µA/*strip* e a voltagem aplicada foi de 500V durante 8 horas, 1000V durante duas horas, 5000V durante uma hora e meia, 5000V até acumular 16000Vh e 500V por seis horas (Fig. 2).

Após a IEF, as *strips* foram equilibradas, para redução e alquilação das proteínas, utilizando tampão de equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS, 0,001% v/v Azul de Bromofenol 0,5%) acrescido de Ditiotreitól (DTT) 10mg/mL, durante 15 minutos, sob leve agitação seguido por mais 15 minutos de tampão de equilíbrio acrescido de Iodoacetamida (IAA) 25mg/mL. Em sequência, as *strips* foram lavadas em tampão Tris/glicina 10%, posicionadas no topo do gel de poliacrilamida – SDS 12% e cobertas por agarose 0,5% previamente aquecida. Nesta fase da eletroforese foi utilizado o equipamento Ettan DALTsix Electrophoresis Unit (GE – Healthcare), com corrente elétrica programada para: um máximo de 50mA,

70 V nos primeiros 15 minutos, seguido de 100V no restante da corrida, que demorou cerca de uma hora.

Após o término da corrida, os géis foram fixados com solução fixadora 1, 2 e 3 (anteriormente descritas) e, após esta fixação, foi acrescentado à última solução, 0,1% de azul brilhante de Comassie G250 4%. Os géis foram corados durante cinco dias, tendo o excesso de corante sido eliminado com solução descorante lenta (metanol 10% e ácido acético 5%). No final os géis foram fotografados e analisados.



**Figura 2 - Programação da corrente elétrica aplicada para focalização isoeétrica das strips de 7cm.** A linha azul do gráfico representa o que foi programado e a linha vermelha representa a corrente que foi realmente aplicada.

## 4 – Resultados

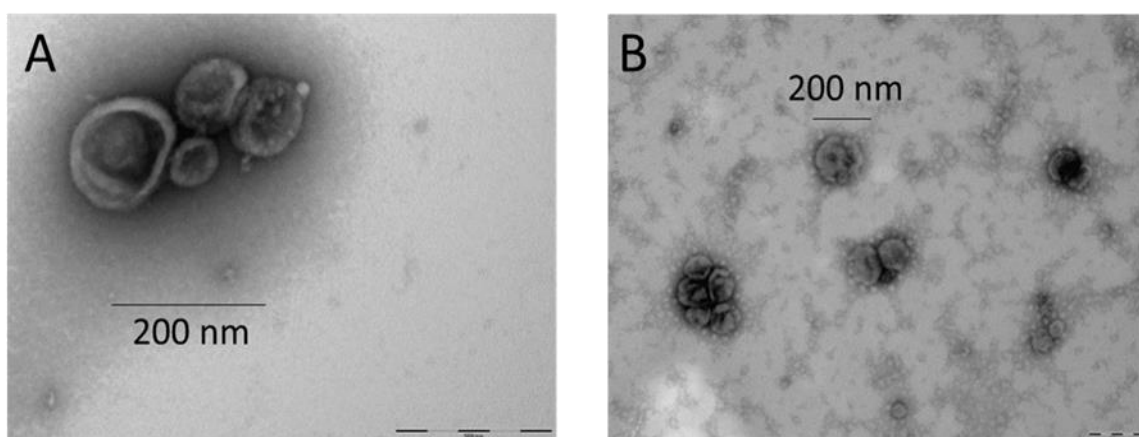
### 4.1 – *In vitro*, promastigotas da espécie *L. amazonensis* libertam vesículas extracelulares

As formas promastigotas de *L. amazonensis* libertaram vesículas extra celulares (VEs) para o meio de cultura, durante as 72 horas de período de vesiculação.

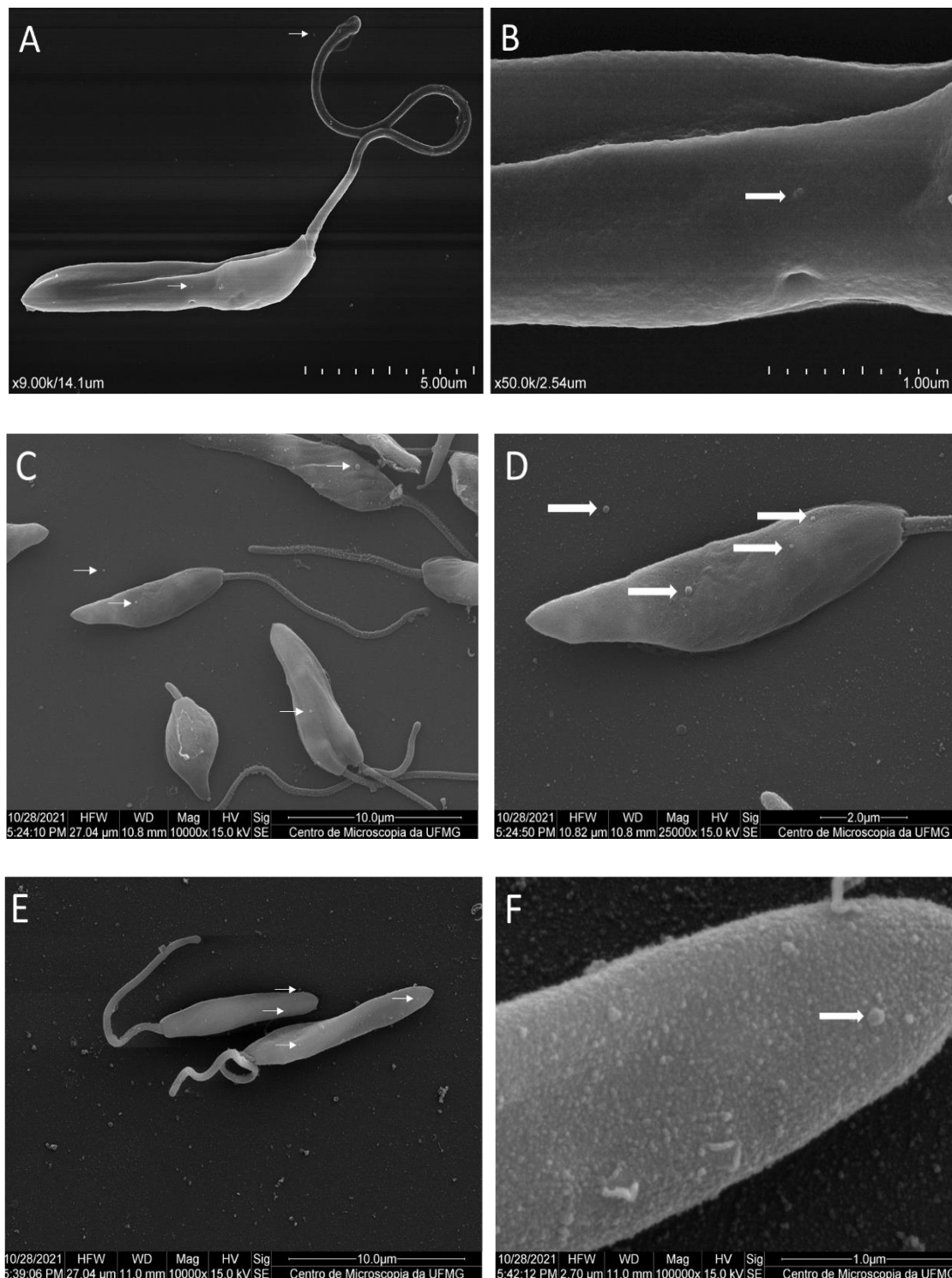
A viabilidade dos parasitas foi avaliada ao final deste período de vesiculação, pelo teste do azul de Tripán e a média de parasitas viáveis foi de 94,2%, 93,8% e 96%, para as estirpes M2269, BA125 e BA336, respectivamente.

As VEs extraídas pela técnica de ultracentrifugação do sobrenadante da cultura de *L. amazonensis* foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e imagens foram adquiridas. As VEs apresentam formas arredondadas e têm, em média, 200 nm de diâmetro (Fig.3).

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (MEV), das estirpes M2269, BA125 e BA336 evidenciaram a formação e liberação das VEs pelos parasitas (Fig 4).



**Figura 3 - Imagem representativa de VEs de *L. amazonensis* em microscopia eletrônica de transmissão (MET).** Após purificação, as VEs das estirpes BA 125 e BA 336 foram fixadas e analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e foram adquiridas imagens.

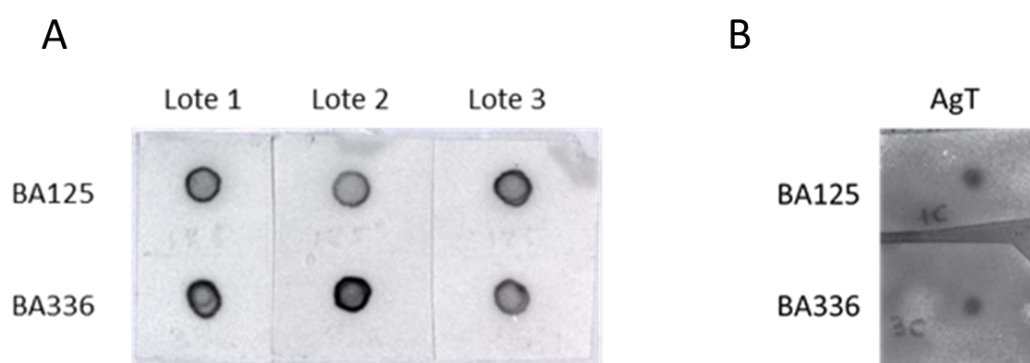


**Figura 4 - Imagem representativa da morfologia do promastigota da espécie *Leishmania amazonensis* e das nanovesículas.** As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) mostram a forma promastigota do parasita, pré-incubada em meio de cultura e fixada em lamínulas contendo poli-L-lisina, com posterior processamento para MEV. Imagens A e B: estirpe M2269; C e D: estirpe BA125 e imagens E e F: estirpe BA336. As setas brancas indicam as VEs, na membrana celular do parasita ou livres.

#### 4.2 – As VEs de *L. amazonensis* contêm a metaloprotease gp63

A técnica de Dot blot efetuado com o extrato puro das VEs de *L. amazonensis* das cepas BA125 e BA336 e anticorpo primário anti-gp63 de *Leishmania* evidenciou a presença da glicoproteína de 63kDa nas VEs, em todas as amostras analisadas. O controle com antígenos totais também foi positivo (Fig. 5).

As imagens dos pontos reativos em ambos os extratos (VEs e antígenos totais), obtidas com o mesmo tempo de exposição e no mesmo momento foram comparadas no aplicativo *Image J*, confirmando a observação visual de que os pontos dos extratos de VEs, mesmo que reativos, eram mais claros que os do extrato de antígenos totais, indicando maior concentração desta proteína nos antígenos totais, em relação às VEs.

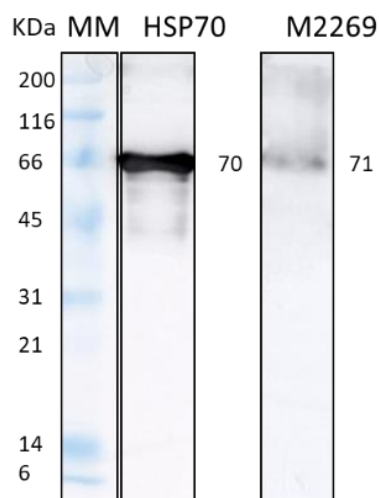


**Figura 5 – Detecção da presença de gp63 nas VEs de *L. amazonensis*.** Após a sensibilização da membrana de nitrocelulose com três lotes biológicos de extrato de VEs de *L. amazonensis* (A) e antígenos totais (AgT) (B) das estirpes BA125 e BA336, o anticorpo primário anti-gp63 (1:500) e secundário anti-*mouse* conjugado a peroxidase (1:500) foram adicionados ao Dot-blot. A reação de quimioluminescência foi captada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS500.

#### 4.3 – VEs de *L. amazonensis* incluem a proteína HSP70

As VEs foram analisadas em SDS-PAGE e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após incubação com anticorpos primários e secundários (soro de coelho anti-HSP70 e anti-coelho conjugado com HRP, respectivamente), a presença da proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) foi demonstrada pela presença de uma banda

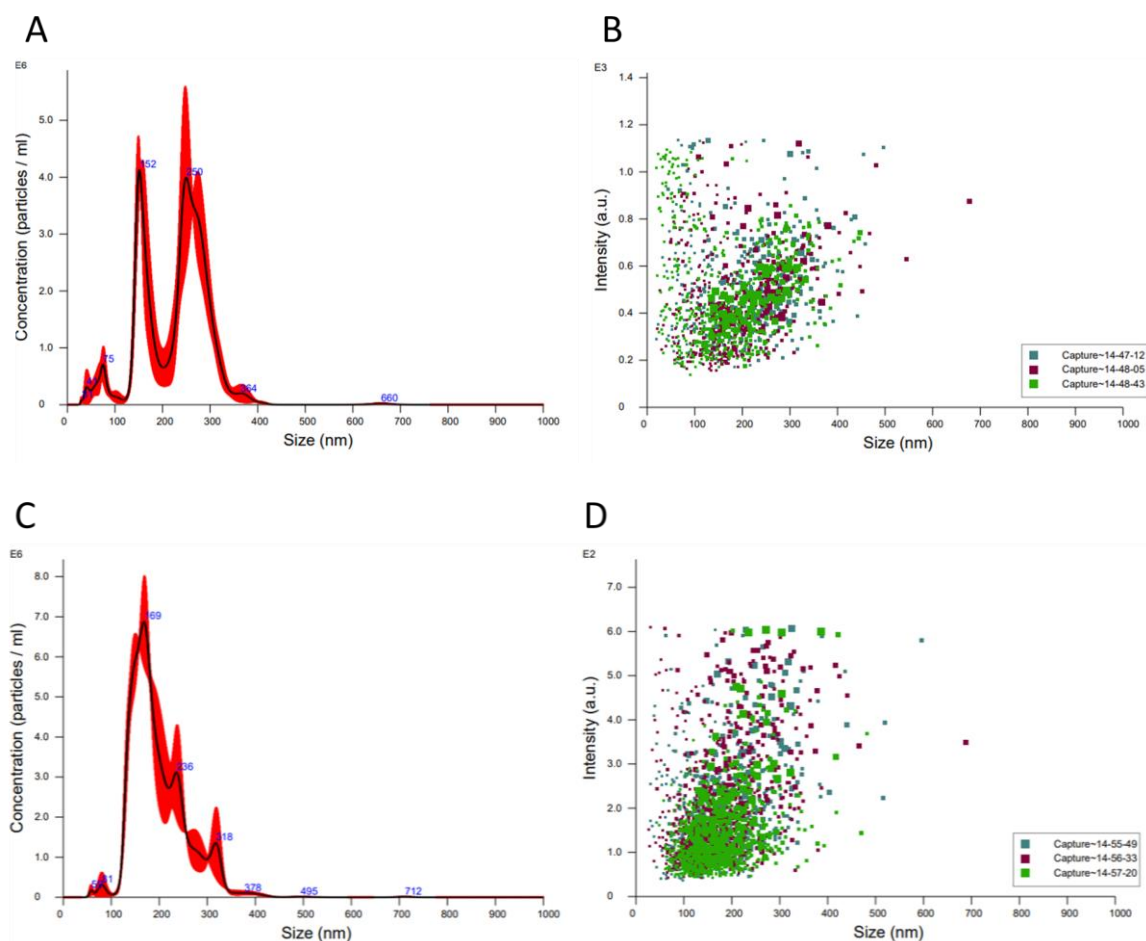
quimioluminescente de mesmo peso molecular que o controle positivo utilizado (HSP70 recombinante) (Fig. 6).



**Figura 6 - Imagem representativa da identificação da proteína HSP70 em VEs.** Após transferência das proteínas das VEs para membrana de nitrocelulose, a membrana foi submetida a incubações sequenciais com anticorpo policlonal anti-HSP70 (1:1500) e anticorpo anti-coelho (1:300) conjugado com peroxidase. As bandas azuis representam as proteínas do padrão de massa molecular (MM); na segunda tira está a proteína recombinante HSP70 (HSP70); na terceira tira, estão as proteínas das VEs da estirpe M2269. A reação de quimioluminescência foi captada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS500.

#### 4.4 – O tamanho das VEs libertadas por promastigotas de *L. amazonensis* variam com a estirpe

Após a ultracentrifugação do sobrenadante das culturas, as partículas foram ressuspendidas em meio de cultura e a distribuição de tamanho e densidade dessas partículas foi obtida por NTA. A análise das VEs purificadas a partir da estirpe BA125 evidenciou a presença de partículas com tamanho entre 31 a 364 nm, sendo mais frequente as VEs com 152 e 250nm e tamanho médio global de 226 nm ( $226,4 \pm 5,4\text{nm}$ ). A estirpe BA336 libertou partículas de 50 a 378 nm, com maior densidade de partículas de 169 nm e média global de 198 nm ( $198,3 \pm 1,9\text{nm}$ ) (Fig. 7). A densidade média das VEs produzidas pelas estirpes BA125 e BA336 foi de  $4,57 \times 10^8$  e  $6,64 \times 10^8$  partículas/mL, respectivamente. Estes resultados indicam que a metodologia de ultracentrifugação permite a extração de VEs produzidas por *L. amazonensis* e libertadas no meio de cultura.



**Figura 7- Tamanho, densidade e intensidade das VEs libertadas por *L. amazonensis*** - O meio de cultura de promastigotas foi ultracentrifugado e as VEs ressuspensas e analisadas por rastreamento de nanopartículas (NTA). A dimensão versus concentração (A e C) e a dimensão *versus* intensidade (B e D) de nanopartículas do meio de cultura de *L. amazonensis*, estirpes BA125 (A e B) e BA336 (C e D) encontram-se representadas graficamente.

#### 4.5– Diferentes metodologias de purificação de VEs apresentam rendimentos proteicos diversos

A massa de proteínas de VEs recuperadas a cada  $10^8$  promastigotas da estirpe M2269 de *L. amazonensis*, purificadas pelo kit *Exosome Spin Columns*, variou entre 1,42 e 5,46mg. O rendimento proteico desta mesma estirpe, quando foi utilizado o reagente comercial *Total Exosome Isolation Reagent*, foi de 0,26 a 0,4 mg/ $10^8$  promastigotas.

Com as estirpes BA125 e BA336 de *L. amazonensis*, a relação de proteínas de VEs obtidas por ultracentrifugação, a cada  $10^8$  promastigotas, variou entre 0,04 e 0,07mg (Tabela 4.1).

Estirpe	método de extração	Nº de parasitas ( $\times 10^8$ )	massa proteica (mg)	massa/parasita (mg/ $10^8$ parasitas)	método de dosagem
M2269	coluna	5,4	29,5	5,46	Espectrofotometria (Nano drop®)
M2269	coluna	5,9	31,4	5,32	Espectrofotometria (Nano drop®)
M2269	coluna	4,2	6,07	1,42	Espectrofotometria (Nano drop®)
M2269	reagente de isolamento	5,9	2,38	0,40	Espectrofotometria (Nano drop®)
M2269	reagente de isolamento	1,8	0,47	0,26	Bradford
BA125	ultracentrifugação	4,6	0,228	0,05	Bradford
BA125	ultracentrifugação	5,2	0,186	0,04	Bradford
BA125	ultracentrifugação	5,4	0,282	0,05	Fluorometria (Qubit®)
BA336	ultracentrifugação	5,6	0,398	0,07	Bradford
BA336	ultracentrifugação	7,6	0,322	0,04	Bradford
BA336	ultracentrifugação	6,3	0,339	0,05	Fluorometria (Qubit®)

**Tabela 4. 1– Concentração proteica das VEs de *L. amazonensis*.** VEs foram isoladas de três estirpes, por três métodos diferentes e a massa proteica foi estimada a partir de diferentes metodologias de dosagem.

#### 4.6 – MØ estimulados por VEs mantém a viabilidade

A viabilidade dos MØ murinos estimulados por VEs de *L. amazonensis* durante 24 horas foi analisada por flurimetria antes da adição de resazurina (tempo zero) e uma hora depois da adição da resazurina. Em paralelo, a viabilidade de MØ em repouso (controlo positivo), MØ expostos a promastigotas de *L. amazonensis*, MØ estimulados com antígeno solúvel de *L. amazonensis*, MØ estimulados com PMA e MØ com paraformaldeído (controlo negativo) foi também analisada (Tabela 4.2).

Os controles positivos (MØ em repouso no meio RPMI ou Schneider) apresentaram elevada fluorescência e o grupo controle negativo (MØ em paraformaldeído) apresentou atividade zero. A transformação da resazurina em resorufina é um indicador direto da capacidade metabólica dos MØ. Considerando que as leituras da fluorescência são diretamente proporcionais à viabilidade celular (Kumar *et al*, 2018), os MØ expostos às VEs, aos promastigotas, ao antígeno total e ao PMA, bem como os MØ em repouso, foram considerados viáveis.

Os valores de fluorescência de três amostras por cada grupo foram analisados e o teste de ANOVA aplicado mostrou que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a atividade celular do grupo controle negativo e os outros grupos, assim como entre os macrófagos em repouso (controlo positivo) e os outros grupos (Fig. 8), indicando que MØ estimulados por VEs e antígeno e MØ expostos aos parasitas mantiveram a viabilidade e até se multiplicaram.

MØ	Fluorescência		
	T0	T1	Incremento (%)
RPMI (CP2)	3354769	7380532	120,00%
Schneider (CP1)	5682493	13621346	139,71%
VEs 7,09 mg/ml	4343849	6887539	58,56%
VEs 3,54 mg/ml	3788870	6059005	59,92%
Leish	5130957	8082756	57,53%
AgT	4448092	7177903	61,37%
PMA	2722070	4525616	66,26%
paraformaldeído (CN)	0	0	0,00%

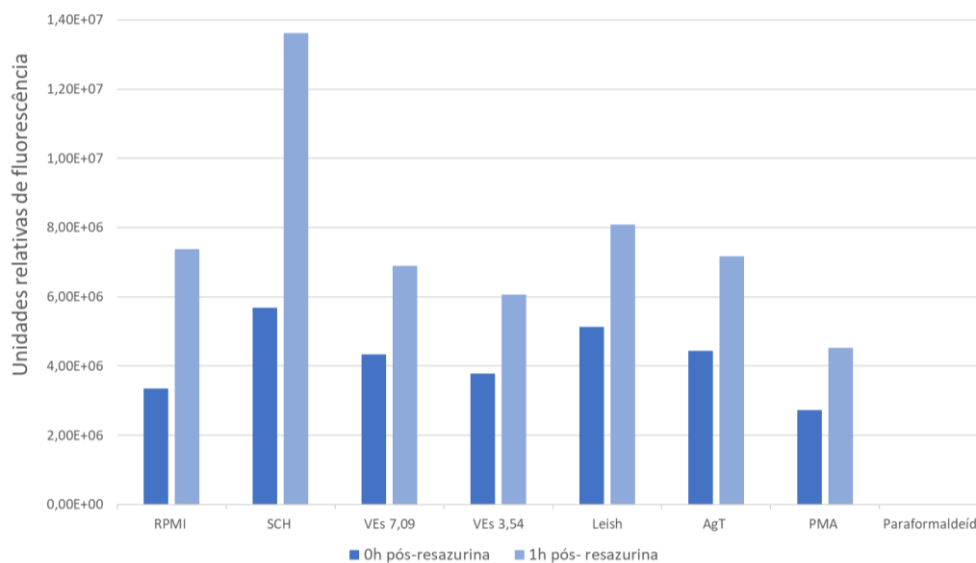
**Tabela 4. 2– Viabilidade de MØ, estimulados com VEs de *L. amazonensis*.** A viabilidade de MØ estimulados por VEs, nas concentrações 7,09 e 3,54µg/µL (VEs 7,09 e VEs 3,54), antígenos totais na concentração 40µg/mL (AgT), PMA na concentração 30µM e MØ expostos a promastigotas de *L. amazonensis*, na proporção 1:3 (Leish) foi determinada pela adição da resazurina (0,0066µg/poço). E a fluorescência foi lida antes da adição (tempo zero) e uma hora após a adição de resazurina. Na tabela encontra-se indicada a média da leitura de fluorescência de três amostras. Como controlo positivo (CP) foram utilizados MØ em meio RPMI + FBS 10% (RPMI) e MØ em meio Schneider + FBS 10% (SCH) e como controlo negativo (CN - células inviáveis) foi utilizado MØ com paraformaldeído 2%. A quarta coluna indica o aumento percentual da intensidade da fluorescência resultante da comparação entre a fluorescência ao tempo zero (T0) e ao fim de uma hora (T1).

#### 4.7- A concentração mais elevada de VEs promove a ativação de MØ com fenótipo M2

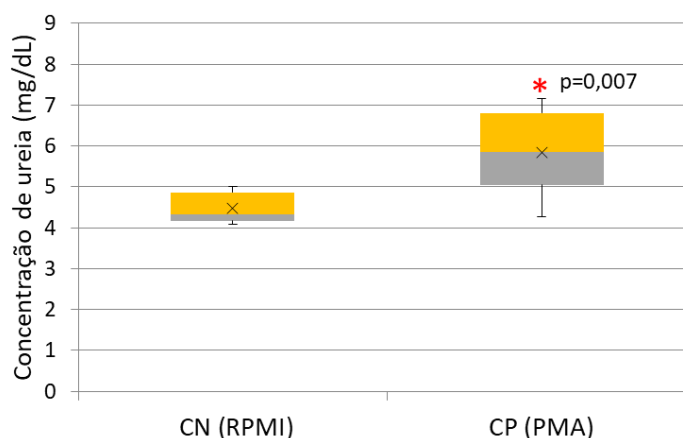
Para avaliar o tipo de atividade dos MØ estimulados pelas VEs, a concentração de ureia foi quantificada ao fim de 24 horas de incubação. Os MØ em meio RPMI produziram, em média, 4,47mg/dL de ureia, enquanto que os MØ em meio Schneider libertaram cerca de 6,82 mg/dL. MØ estimulados com PMA (controle positivo) apresentaram uma concentração média de ureia de 5,83 mg/dL. A análise comparativa entre os controles positivo e negativo no mesmo meio de cultura (MØ em RPMI + PMA e MØ em RPMI) mostrou produção significativamente elevada de ureia no grupo controle positivo ( $p=0,007$ ) (Fig. 9).

A concentração média de ureia produzida pelos MØ foi: 8,01 mg/dL no grupo das VEs mais concentradas; 7,67mg/dL no grupo das VEs mais diluídas; 4,17 mg/dL no grupo do extrato antigênico; e 4,57 mg/dL no grupo de MØ expostos aos promastigotas de *L. amazonensis*;

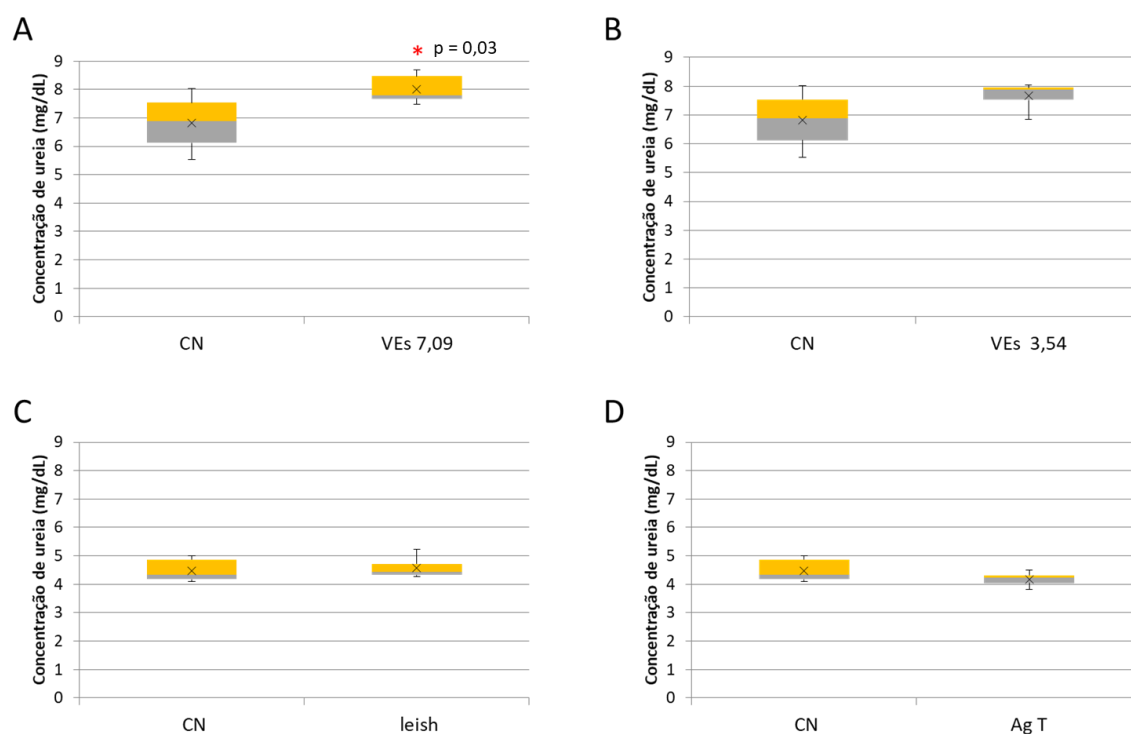
Apenas os MØ estimulados com a concentração mais elevada de VEs produziram significativamente mais ureia que o controlo negativo ( $p=0,03$ ) (Fig 10).



**Figura 8– Viabilidade dos MØ após a estimulação com VEs.** O teste foi realizado 24h após incubação dos MØ com VEs na concentração de 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L (VEs 7,09), VEs na concentração de 3,54 $\mu$ g/ $\mu$ L (VEs 3,54), *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por MØ (Leish), antígeno total na concentração de 40 $\mu$ g/mL (AgT) e PMA na concentração de 30 $\mu$ M e a leitura de fluorescência foi realizada ao tempo zero e 1h após adição de resazurina. Os controles positivos foram MØ em repouso em meio RPMI + FBS 10% (RPMI) e MØ em repouso em meio Schneider + FBS 10% (SCH). O controle negativo (células inviáveis) foram MØ expostos à solução de paraformaldeído a 2%. A média da leitura de três amostras está representada por gráfico de linhas. Os símbolos (\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os controles positivos (RPMI e SCH), controle negativo (paraformaldeído) e as demais condições.



**Figura 9 - Produção de ureia por MØ não estimulados e estimulados por PMA.** MØ incubados em RPMI + FBS10% constituíram o controle negativo (CN) e MØ estimulados por PMA, na concentração de 30 $\mu$ M, foram usados como controle positivo. Os resultados de três experiências independentes e de duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo *Wilcoxon signed rank test* ( $p < 0,05$ ) para amostras emparelhadas. O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o CN e o CP.



**Figura 10- Produção de ureia por MØ estimulados por VEs de *L. amazonensis*.** A ureia foi quantificada no sobrenadante de MØ estimulados por: VEs na concentração de 7µg/µL (VEs 7,09) (A) e 3,5µg/µL (VEs 3,54) (B), promastigotas de *L. amazonensis* (leish) (C) e extrato antigênico na concentração de 40µg/mL (AgT) (D). Em paralelo, sobrenadantes de MØ em repouso foram utilizados como controlo negativo (CN). Os resultados de três experiências independentes e de duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, indicando médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados por *Wilcoxon signed rank test* ( $p < 0,05$ ) para amostras emparelhadas. O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o CN e os MØ estimulados com 7µg/µL de VEs.

#### 4.8 – Promastigotas e VEs de *L. amazonensis* inibem a produção de IL-1β por MØ

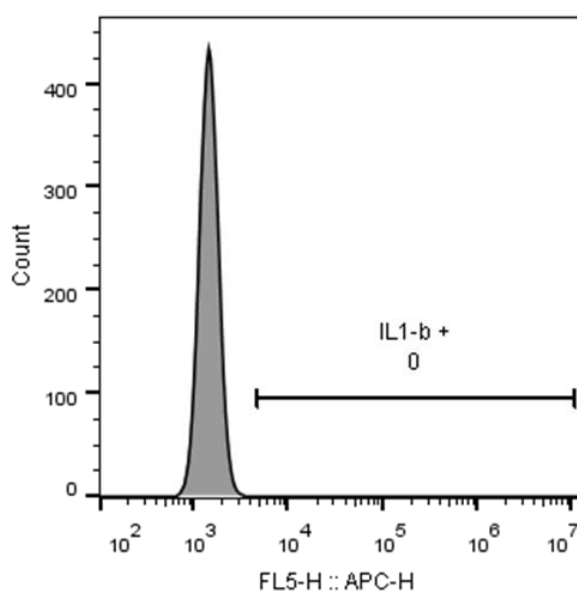
Para analisar a produção de IL-1β pelos MØ, as células foram marcadas com anticorpos anti-IL-1β conjugado ao fluorocromo APC. O histograma e a fluorescência dos MØ não marcados com este anticorpo foram utilizados para selecionar os eventos que representavam MØ IL-1β<sup>+</sup> (Fig. 11).

Cerca de 1,6% de células dos dois controles negativos (MØ em repouso nos meios RPMI + FBS 10% ou Schneider + FBS 10%) produziram IL-1β, indicando que nestas condições ocorrem expressão basal desta citocina. O controle positivo (MØ estimulados com PMA) evidenciou aumento da frequência das células que produzem IL-1β. O teste ANOVA aplicado entre os controles negativos e positivo mostrou uma diferença

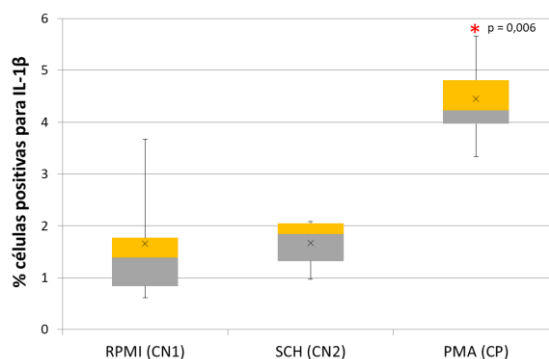
significativa entre as médias ( $p=0,006$ ), demonstrando que as células utilizadas estavam viáveis e funcionais (Fig. 12).

A produção de IL-1 $\beta$  por M $\phi$  estimulados com o extrato antigênico (1,58%) foi semelhante ao controlo negativo, indicando que o antígeno total não interferiu na produção de IL-1 $\beta$  pelos M $\phi$  (Fig 11). Os M $\phi$  estimulados com 7 e 3,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de VEs apresentaram, respectivamente, 0,23% e 0,39% de células produzindo IL-1 $\beta$ . Em relação ao grupo de células em repouso, a produção de IL-1 $\beta$  pelos M $\phi$  foi significativamente menor ( $p=0,0006$  e  $p=0,0007$ ). De modo semelhante, apenas 0,5% dos M $\phi$  expostos aos promastigotas produziram IL-1 $\beta$ , sendo significativamente diferente do controlo negativo ( $p=0,001$ ) (Fig. 13).

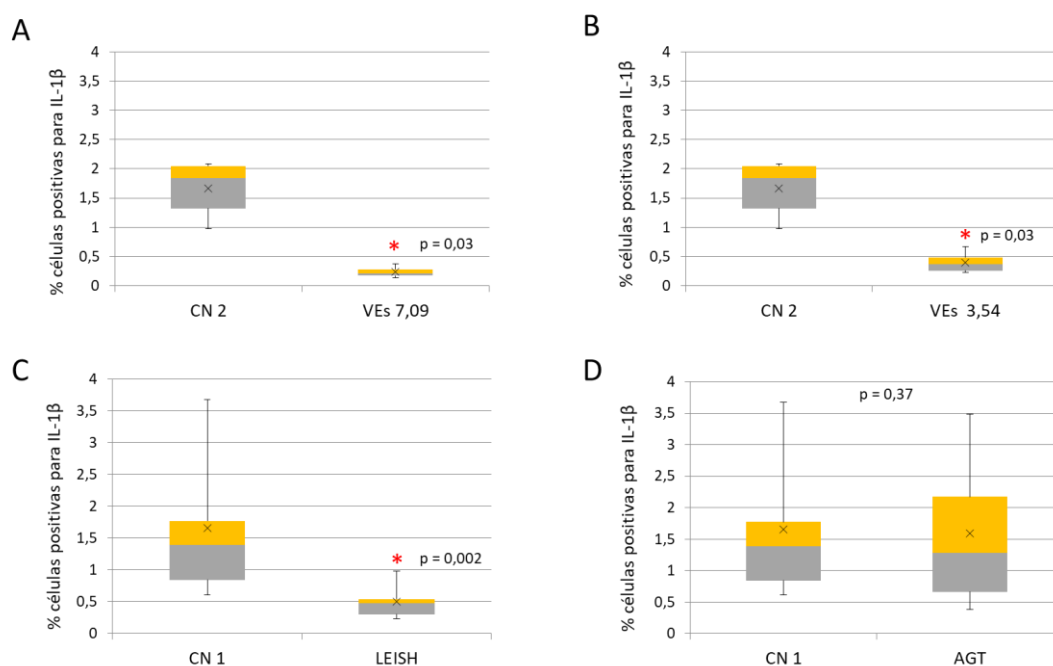
Estes resultados sugerem que os parasitas e as VEs, independentemente da concentração utilizada, inibem rapidamente (no período de 24 horas) a produção de IL-1 $\beta$  pelos M $\phi$ . A presença das vesículas extra celulares, bem como dos parasitas provocaram, nos M $\phi$ , a redução da produção de IL-1 $\beta$ , em relação à produção basal do controle negativo (Fig. 14).



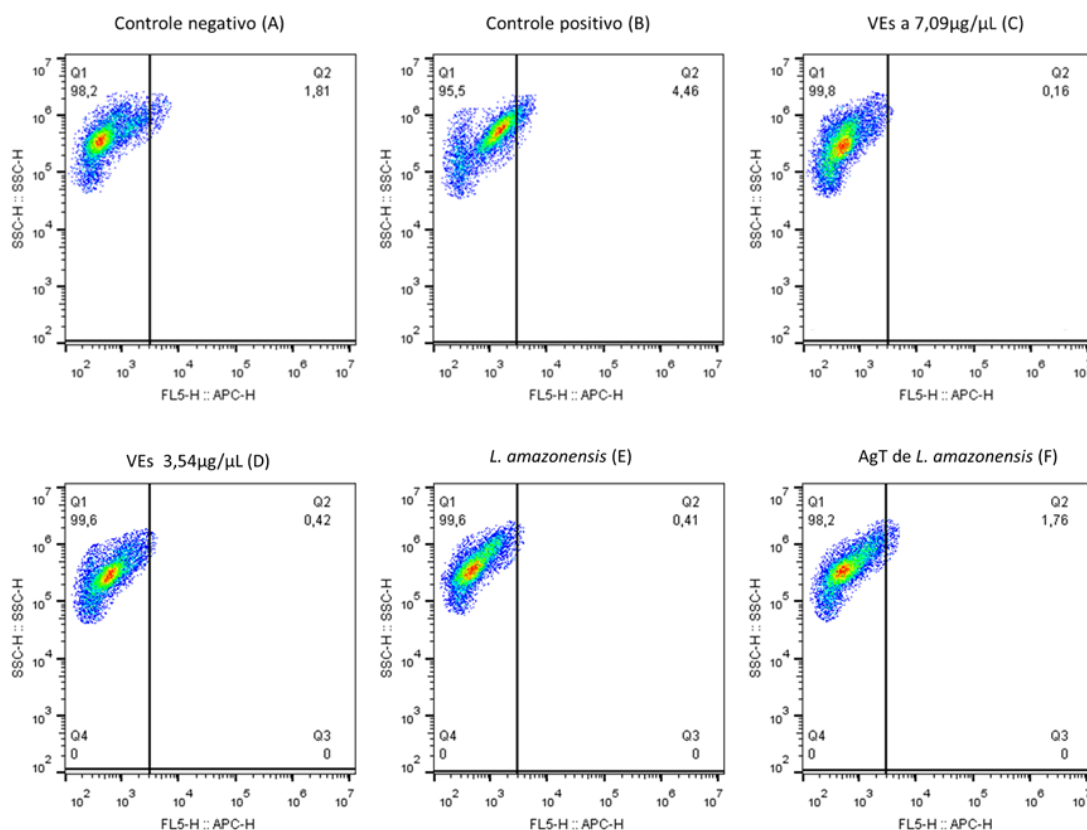
**Figura 11– M $\phi$  não marcados com anti-IL-1 $\beta$ .** O histograma dos M $\phi$  não marcados com anticorpo anti-IL-1 $\beta$  foram utilizados para determinar os limites de fluorescência positivos para esta interleucina.



**Figura 12 - Produção de IL-1 $\beta$  por M $\emptyset$  controle.** Após 24h de incubação, M $\emptyset$  em meio de cultura RPMI + FBS10% (Controlo negativo 1/CN1); em meio Schneider + FBS10% (controlo negativo 2/ CN2); e em meio de cultura (RPMI + FBS10%) com 30 $\mu$ M de PMA (controlo positivo/ CP) foram marcados com anticorpo anti-IL-1 $\beta$  e analisados por citometria de fluxo. Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste de ANOVA ( $p < 0,05$ ), com análise *post hoc* de Games-Howell. O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o CP e os CNs.



**Figura 13 - Produção de IL-1 $\beta$  por M $\emptyset$  estimulados com VEs.** M $\emptyset$  estimulados com VEs na concentração de 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L (A) e 3,54 $\mu$ g/ $\mu$ L (B), expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por M $\emptyset$  (C), estimulados por antígeno total na concentração de 40 $\mu$ g/mL (D) e M $\emptyset$  não estimulados (controles negativos - CN1 e CN2) foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes. Os resultados foram estatisticamente analisados por *Wilcoxon signed rank test* ( $p < 0,05$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 14**– Plots representivos da produção de IL-1 $\beta$  por M $\phi$  estimulados com VEs. M $\phi$  estimulados com VEs na concentração de 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L e 3,54 $\mu$ g/ $\mu$ L; antígeno total na concentração de 40 $\mu$ g/mL e expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por M $\phi$  foram marcados com anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$  e analisados por citometria de fluxo. Em paralelo foram também analisados os controles negativo e positivo.

#### 4.9 – As VEs de *L. amazonensis* não interferem com a apresentação antigênica através das moléculas de classe I do MHC

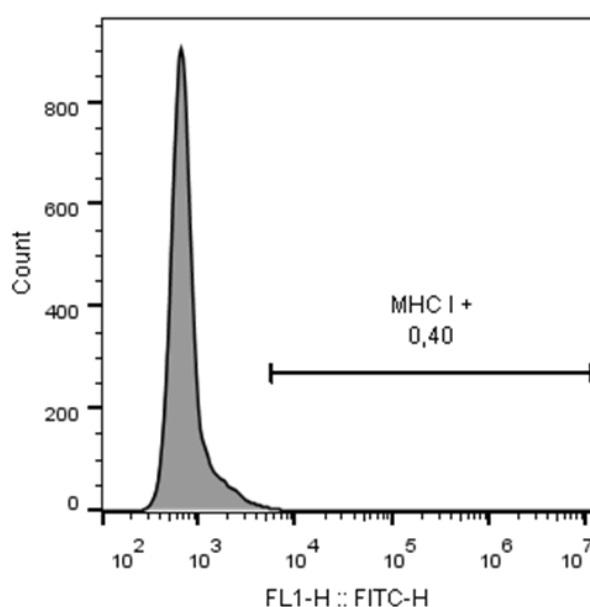
Para analisar a capacidade dos M $\phi$  murinos em apresentarem os antígenos das VEs aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, fomos analisar a expressão das moléculas de classe I do MHC, por meio da citometria de fluxo. As células foram marcadas com anticorpos anti-MHC I conjugado ao fluorocromo FITC. A fluorescência dos M $\phi$  não marcados com este anticorpo foi utilizada para selecionar os eventos que representavam M $\phi$  MHC I<sup>+</sup> (Fig. 15).

Nos grupos controle negativo (MØ em repouso), a média de frequência de MØ MHC I<sup>+</sup> foi de 78,1% (RPMI + FBS 10%) e 78,4% (Schneider + FBS 10). O grupo controle positivo (MØ estimulados com PMA) exibiu uma frequência média de 66,9% de MØ MHC I<sup>+</sup>. O teste de ANOVA com *post hoc* de Games Howell aplicado entre os controles negativos e positivo mostrou diferença significativa ( $p=0,02$ ) (Fig. 16).

Nos MØ estimulados por VEs, a frequência de MØ MHC I<sup>+</sup> foi de 74,4% (7 µg/µL de proteínas das VEs) e 80,4% (3,5 µg/µL de proteínas das VEs). A exposição dos MØ aos promastigotas gerou uma frequência média de 73,5% de MØ MHC I<sup>+</sup>, enquanto que MØ estimulados por extrato antigênico evidenciaram 68,5% de MØ MHC I<sup>+</sup>.

Quando comparados com o controle negativo (RPMI + FBS 10%), a frequência dos MØ MHC I<sup>+</sup> estimulados pelo antígeno era significativamente menor ( $p=0,02$ ) (Fig. 17), indicando que o antígeno total de *L. amazonensis* é pouco apresentado pelo complexo MHC I.

A população positiva para a expressão de moléculas MHC I é menor no grupo estimulado com PMA e com antígenos totais quando comparado aos MØ em repouso (Fig. 18).



**Figura 15- MØ não marcados com anti-MHC I.** O histograma de MØ não marcados com anti-MHC I foram utilizados para determinar os limites de fluorescência positiva para MØ MHC I<sup>+</sup>.

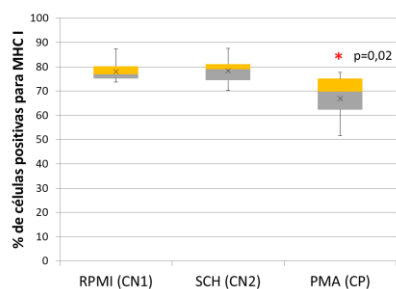


Figura 16– Frequência de  $M\phi$  MHC I<sup>+</sup> nas populações de  $M\phi$  controle.  $M\phi$  incubados durante 24 horas, em meio de cultura RPMI + FBS10% (controle negativo - CN1), em meio Schneider + FBS 10% (controle negativo - CN2), em meio de cultura (RPMI + FBS10%) com PMA (30 $\mu$ M) (controle positivo – CP), foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC I e analisados por citometria de fluxo. Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, indicando médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ), com análise *post hoc* de Games Howell. O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o CP e os CNs.

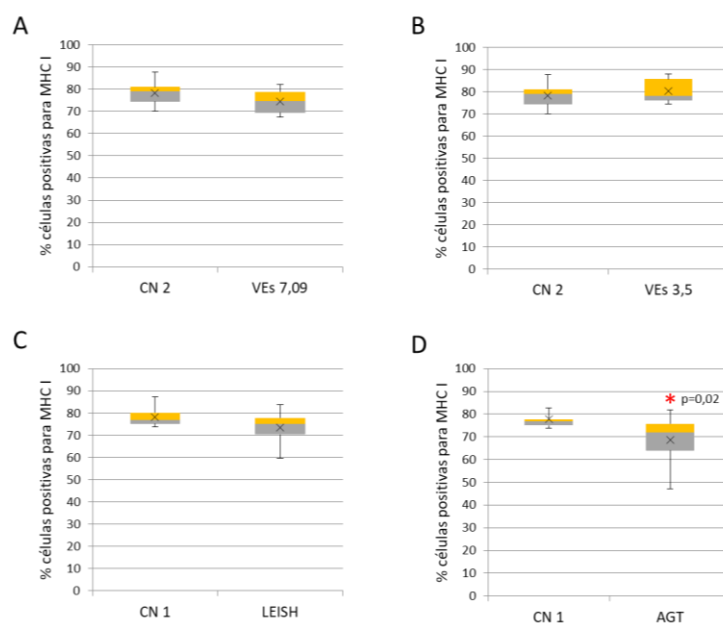
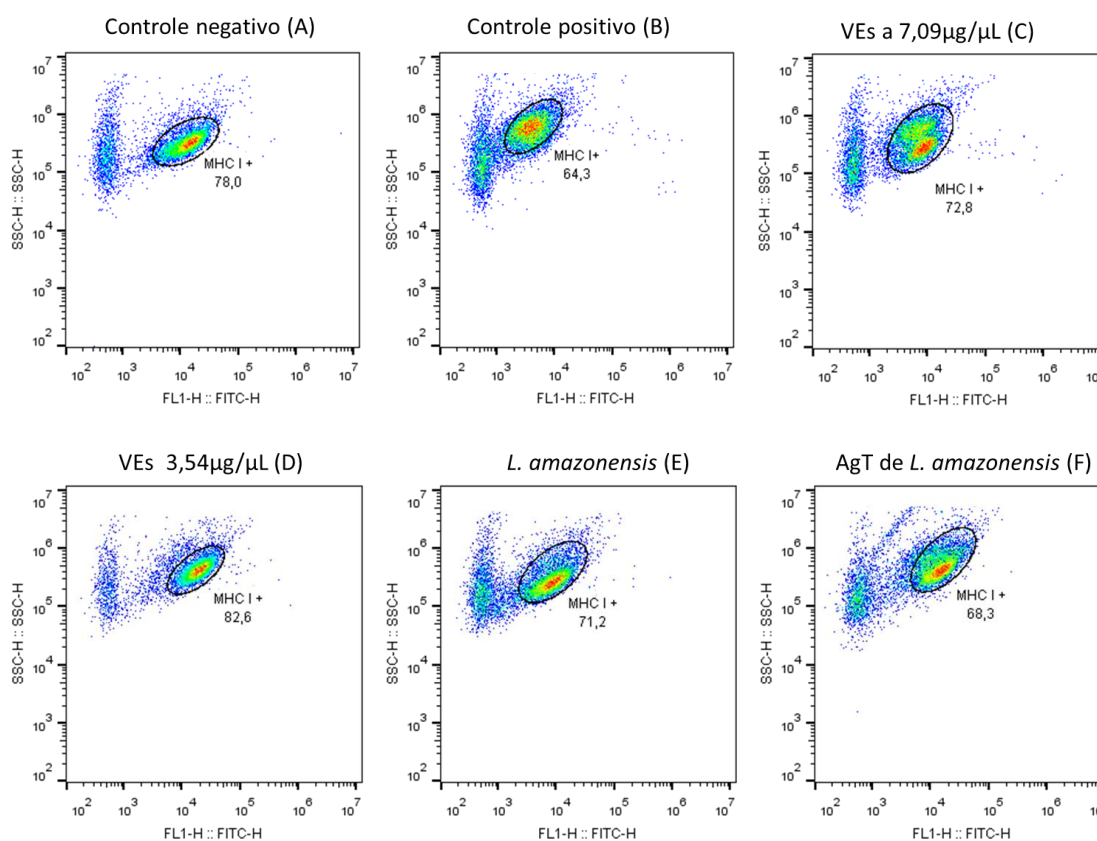


Figura 17– Frequência de  $M\phi$  MHC I<sup>+</sup> nas populações de  $M\phi$  estimuladas por VEs.  $M\phi$  estimulados durante 24 horas com VEs na concentração de 7,09 $\mu$ g/ $\mu$ L (A) e na concentração de 3,54 $\mu$ g/ $\mu$ L (B), expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por  $M\phi$  (C) e estimulados com antígenos totais (40 $\mu$ g/mL) (D) foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC I e analisados por citometria de fluxo. Os controles negativos foram  $M\phi$  em repouso em meio RPMI + FBS 10% (CN1) e  $M\phi$  em repouso em meio Schneider + FBS 10% (CN2). Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, indicando médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados por *Wilcoxon signed rank test* ( $p < 0,05$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o grupo exposto ao extrato antigênico quando comparado ao controle negativo.



**Figura 18–** Plots representativos da frequência de MØ MHC I<sup>+</sup> após estimulação com VEs. MØ estimulados com VEs na concentração de 7,09µg/µL e 3,54µg/µL e antígeno total na concentração de 40µg/mL e MØ expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por MØ foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC I e analisados por citometria de fluxo. Em paralelo foram também analisados os controles negativo e positivo.

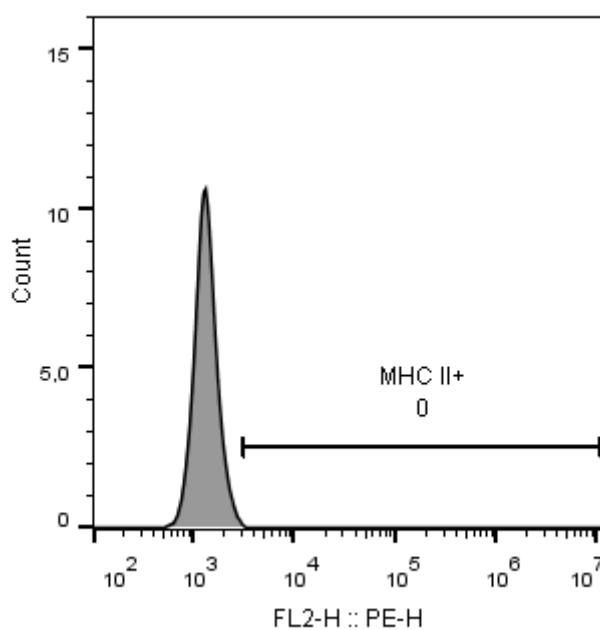
#### 4.10 – As VEs de *L. amazonensis* não interferem com a expressão constitutiva das moléculas de classe II dos MØ murinos

Para investigar a capacidade dos MØ murinos em apresentarem os antígenos das VEs aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi analisado a expressão das moléculas de classe II do MHC por meio da citometria de fluxo. As células foram marcadas com anticorpos anti-MHC II conjugado ao fluorocromo PE. O histograma e a fluorescência dos MØ não marcados com este anticorpo foram utilizados para selecionar os eventos que representavam MØ MHC II<sup>+</sup> (Fig. 19).

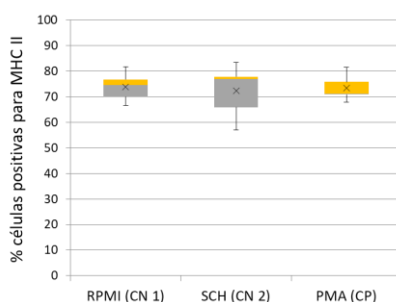
Nos grupos controle negativo (MØ em repouso), a média de frequência de MØ MHC II<sup>+</sup> foi de 73,8% (RPMI + FBS 10%) e 72,4% (Schneider + FBS 10%). O grupo controle positivo (MØ estimulados com PMA) apresentou uma frequência média de 73,4% de células que expressaram MHC II (Fig. 20).

Nos grupos expostos às VEs, a frequência média de MØ MHC II<sup>+</sup> foi de 74,2% e 75,8%, respectivamente, para os grupos estimulados com VEs a 7 e 3,5 µg/µL de proteínas. MØ expostos aos promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram uma frequência média de 71,8% de células MHC II<sup>+</sup>, enquanto a frequência média dos MØ estimulados pelo extrato parasitário foi de 64,5%. Quando comparados com o controle negativo (RPMI + FBS 10%), a frequência dos MØ MHC II<sup>+</sup> estimulados pelo antígeno era significativamente menor ( $p=0,03$ ) (Fig. 21), indicando que o antígeno total de *L. amazonensis* é pouco apresentado pelo complexo MHC II.

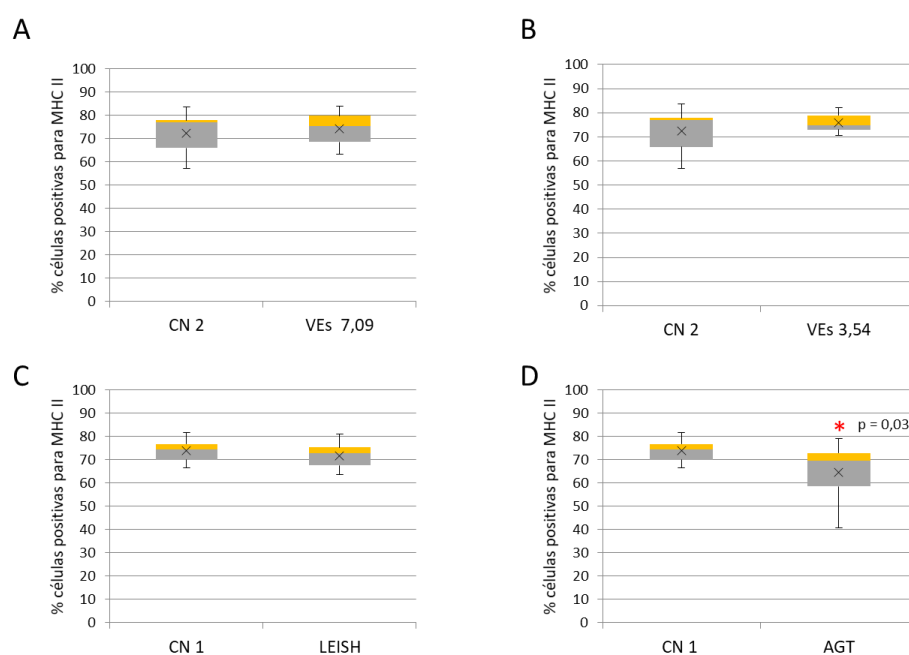
A população positiva para a expressão de moléculas MHC II é menor somente nos MØ expostos ao antígeno total de *L. amazonensis* (Fig. 22).



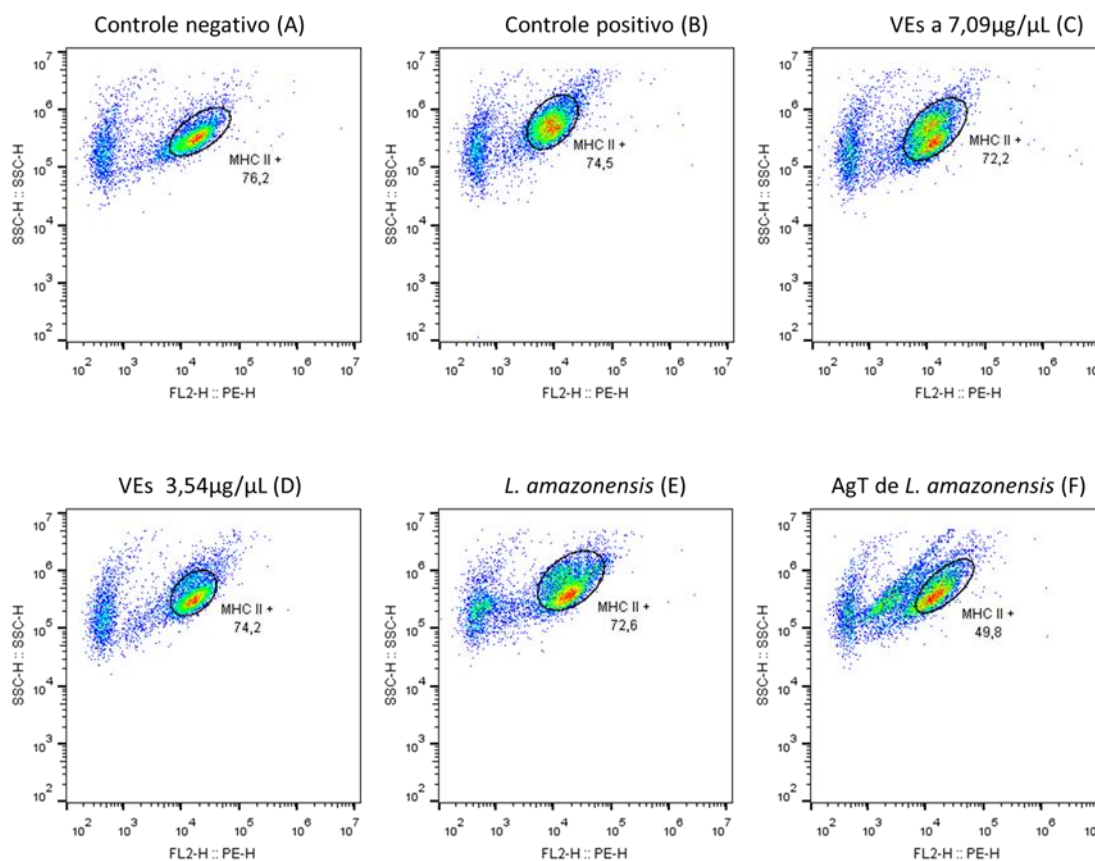
**Figura 19- MØ não marcados com anti-MHC II.** O histograma dos MØ não marcados com anticorpo anti-MHC II foram utilizados para determinar os limites de fluorescência positivos para MØ MHC II<sup>+</sup>.



**Figura 20– Frequência de MØ MHC II<sup>+</sup> nas populações de MØ controle.** MØ incubados durante 24 horas, em meio de cultura RPMI + FBS10% (controle negativo - CN1), em meio Schneider + FBS 10% (controle negativo - CN2), em meio de cultura (RPMI + FBS10%) com PMA (30µM) (controle positivo – CP), foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC II e analisados por citometria de fluxo. Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, indicando médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ), com análise *post hoc* de Games Howell. O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o CP e os CNs.



**Figura 21– Frequência de MØ MHC II<sup>+</sup> nas populações de MØ estimuladas por VEs.** MØ estimulados durante 24 horas com VEs na concentração de 7,09µg/µL (A), na concentração de 3,54µg/µL (B), expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por MØ (C) e estimulados com antígenos totais (40µg/mL) (D), foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC II e analisados por citometria de fluxo. Os controles negativos foram MØ em repouso em meio RPMI + FBS 10% (CN1) e MØ em repouso em meio Schneider + FBS 10% (CN2). Os resultados de três experiências independentes e duplicatas por amostra encontram-se representados por caixas de bigodes, indicando médias, máximos e mínimos. Os resultados foram estatisticamente analisados por *Wilcoxon signed rank test* ( $p < 0,05$ ). O símbolo (\*) indica diferenças significativas entre o grupo exposto ao extrato antigênico quando comparado ao controle negativo.

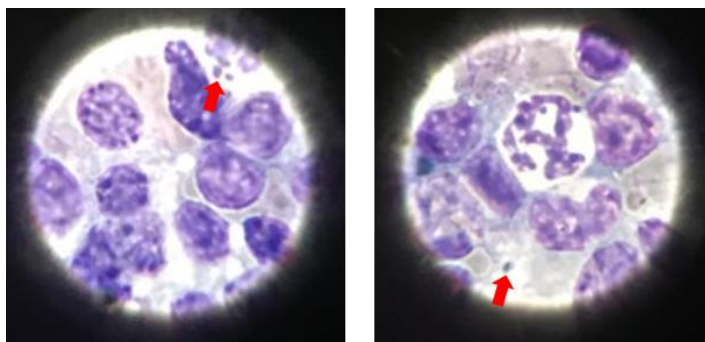


**Figura 22**– Plots representativos da frequência de MØ MHC II<sup>+</sup> estimulados com VEs. MØ estimulados com VEs na concentração de 7,09µg/µL e 3,54µg/µL e antígeno total na concentração de 40µg/mL e MØ expostos a promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de três parasitas por MØ foram marcados com anticorpo monoclonal anti-MHC II e analisados por citometria de fluxo. Em paralelo foram também analisados os controles negativo e positivo.

#### 4.11 – Promastigotas de *L. amazonensis* infectam camundongos

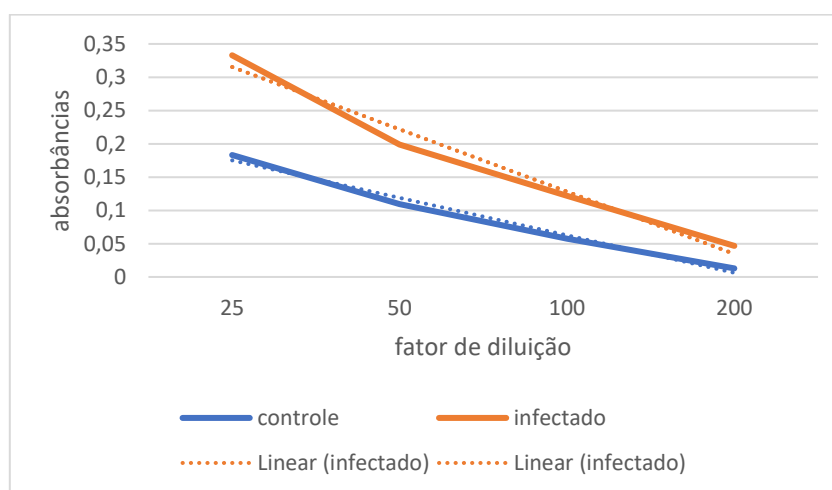
Após oito semanas de infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia, para retirada do soro. No grupo de camundongos infectados, além do soro, foram retirados fragmentos dos baços e, por meio de *imprint* seguido de coloração com Giemsa, foram identificadas formas amastigotas de *L. amazonensis* (Fig. 23). Este resultado confirma a infecção dos camundongos BALB/c, cujo soro foi utilizado para análise de imunorreatividade das VEs.

O pool de sangue colhido de cada grupo dos camundongos (infectados e controle negativo), foi centrifugado a 2000g, tendo sido recuperado 1,15mL de soro do grupo infectado e 1,2mL de soro do grupo controle negativo.



**Figura 23 – Formas amastigotas em camundongos infetados com promastigotas de *L. amazonensis*.** Decalques de baço corado com solução de Giemsa e observados por microscopia ótica. Após oito semanas de infecção, formas amastigotas de *L. amazonensis* (setas vermelhas) parasitam o baço de camundongos BALB/c. Imagem de microscopia, com ampliação de 1000 $\times$ .

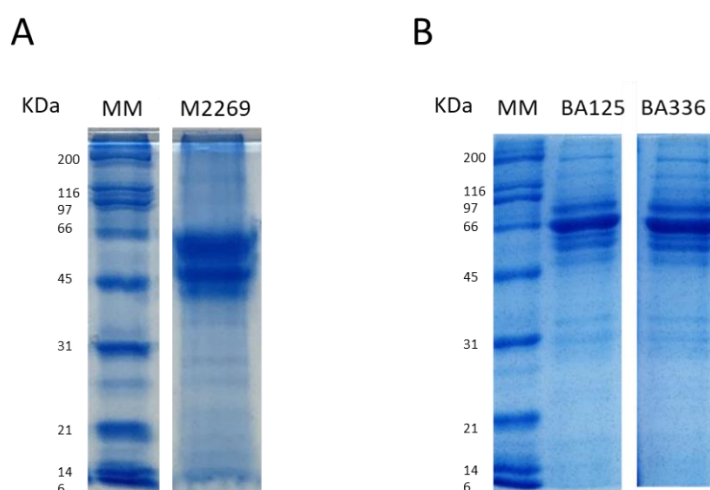
A confirmação da infecção foi feita por titulação de anticorpos IgG por ELISA. Os valores de *cutoff* calculados para as titulações 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200 foram, respectivamente, 0,219, 0,111, 0,068 e 0,015. O resultado foi considerado positivo para o grupo infectado, em todas as titulações testadas, com os respectivos valores: 0,33, 0,19, 0,12 e 0,04 (Fig. 24).



**Figura 24 – Gráfico representativo do nível de anticorpos IgG anti *L. amazonensis* nos camundongos experimentalmente infetados.** Soro de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e soro de camundongos não infetados foram analisados por ELISA *in house*. Foram avaliadas quatro titulações (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200), em triplicata e obtido um gráfico de regressão linear com as titulações do soro infectado (traçado laranja) e do soro controle negativo (traçado azul), com os respectivos  $R^2=0,97$  e  $0,98$ .

#### 4.12 – As VEs de *L. amazonensis* são constituídas por frações proteicas com massa molecular acima de 21kDa

A eletroforese das VEs em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), permitiu obter um perfil de bandas proteicas semelhantes nas estirpes BA125 e BA336, mas diferente na estirpe M2269 (Fig. 25). As VEs das estirpes BA125 e BA336 apresentaram um conjunto de bandas proteicas compreendidas entre 122 e 31 kDa. As bandas proteicas mais intensas tinham as seguintes massas: 84, 76, 66 e 62 kDa. As da estirpe M2269 apresentaram um conjunto de bandas proteicas compreendidas entre 128 e 21 kDa, sendo as mais intensas: 79, 66, 55 e 48 kDa. O valor do  $R^2$  das curvas de calibração dos géis M2269 e BA125/336 foram de 0,95 e 0,97 respectivamente.

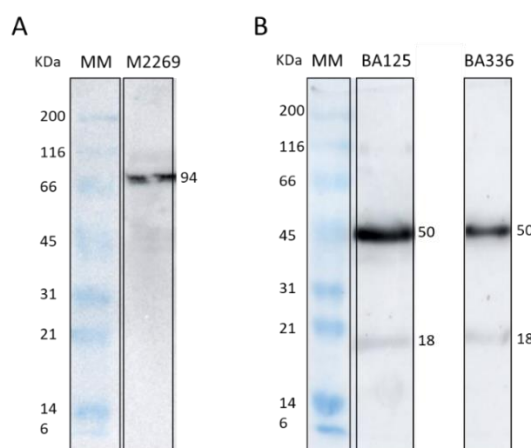


**Figura 25– Imagem representativa da eletroforese proteica das VEs.** As proteínas das VEs das estirpes M2269 (A) e BA125 e BA336 (B) de *L. amazonensis* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e corados com Comassie Blue G250. As massas moleculares das proteínas dos padrões (MM) estão registradas nas laterais das tiras.

#### 4.13 – Os soros de camundongos infectados por *L. amazonensis* são reativos às VEs

As VEs possuem proteínas que são reconhecidas por anticorpos de camundongos BALB/c previamente infectados com *L. amazonensis*. As proteínas das VEs foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. As tiras de nitrocelulose foram incubadas com soro de camundongos previamente infectados por *L. amazonensis* (1:100). O soro de camundongo possuía anticorpos com reatividade para algumas bandas proteicas. Na estirpe M2269 a reatividade foi com uma banda de proteína cuja massa molecular é de cerca de 94kDa. Nas estirpes BA125 e BA336 as duas bandas mais fortemente reativas para o soro eram semelhantes e tinham massa molecular de 50

e 18 kDa (Fig. 26). O soro do grupo controle negativo, não apresentou reatividade para nenhuma banda proteica. Este teste foi realizado em triplicata, com reprodutibilidade dos resultados. O  $R^2$  da curva de calibração do padrão de peso molecular foi 0,96.

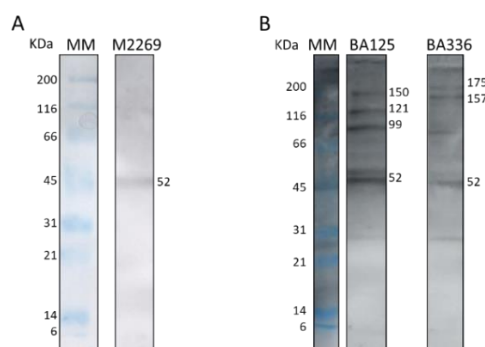


**Figura 26– Imagem representativa das bandas proteicas das VEs reconhecidas por soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*.** Após transferência das proteínas das VEs para membranas de nitrocelulose, as membranas foram incubadas com soro de camundongos infectados (1:100), anticorpo secundário IgG anti-mouse (1:500) conjugado com peroxidase. Os números nas laterais das tiras representam a massa molecular das frações proteicas. As bandas azuis representam as proteínas do padrão de massa molecular (MM); nas demais tiras estão as proteínas das VEs da estirpe M2269 (A), BA125 e BA336 (B). Os testes foram feitos em triplicata, para cada estirpe. A reação de quimioluminescência foi captada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS500.

#### 4.14 – Soro de humanos portadores de LTA apresenta imunorreatividade para as VEs

Para verificar se os soros de doentes com LTA tinham anticorpos contra as VEs, foi efetuado o teste Western blot. As proteínas das VEs foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. As tiras de nitrocelulose foram incubadas sequencialmente em soro de humanos portadores de LTA (1:100) e anti-IgG humano conjugado com peroxidase. O resultado confirmou a reatividade. Uma banda proteica reativa, com massa molecular de 52 kDa foi comum às VEs de todas as estirpes. Na estirpe BA125, além desta fração proteica, as frações proteicas de massa molecular de 150, 121 e 99 kDa também foram reconhecidas pelos anticorpos dos soros. Na estirpe BA336, além da banda comum às outras estirpes, outras duas, cujas massas foram 175 e 157 kDa também mostraram reatividade (Fig.27). No Western blot feito com soro do

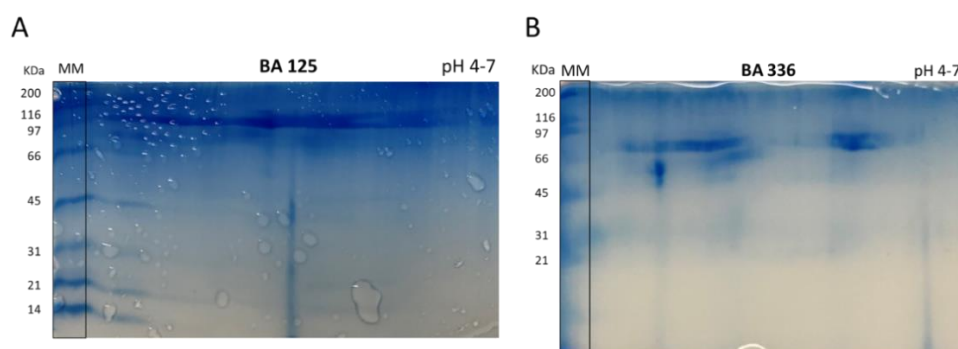
grupo controle negativo, não foram identificadas bandas reativas. O  $R^2$  da curva de calibração do padrão de massa molecular foi 0,96.



**Figura 27– Imagem representativa das bandas proteicas das VEs reconhecidas por soro de humanos portadores de LTA.** Após transferência das proteínas das VEs para membrana de nitrocelulose, as membranas foram incubadas com soro de humanos portadores de LTA (1:100) e anticorpo secundário IgG anti-humano (1:5000), conjugado com peroxidase. Os números nas laterais das tiras representam a massa molecular das proteínas. As bandas azuis representam as proteínas do padrão de massa molecular (MM); nas demais tiras estão as proteínas das VEs da estirpe M2269 (A), BA125 e BA336 (B). Os testes foram feitos em duplicata, para cada estirpe. A reação de quimioluminescência foi captada pelo sistema de câmera digital CCD do aparelho ImageQuant™ LAS500.

#### 4.15 - VEs de *L. amazonensis* contém proteínas de alto, média e baixa massa molecular

A eletroforese bidimensional realizada com as VEs das estirpes BA125 e BA336, mostrou um perfil semelhante entre elas, com *spots* concentrados entre as massas moleculares de 45 e 97kDa (Fig. 28).

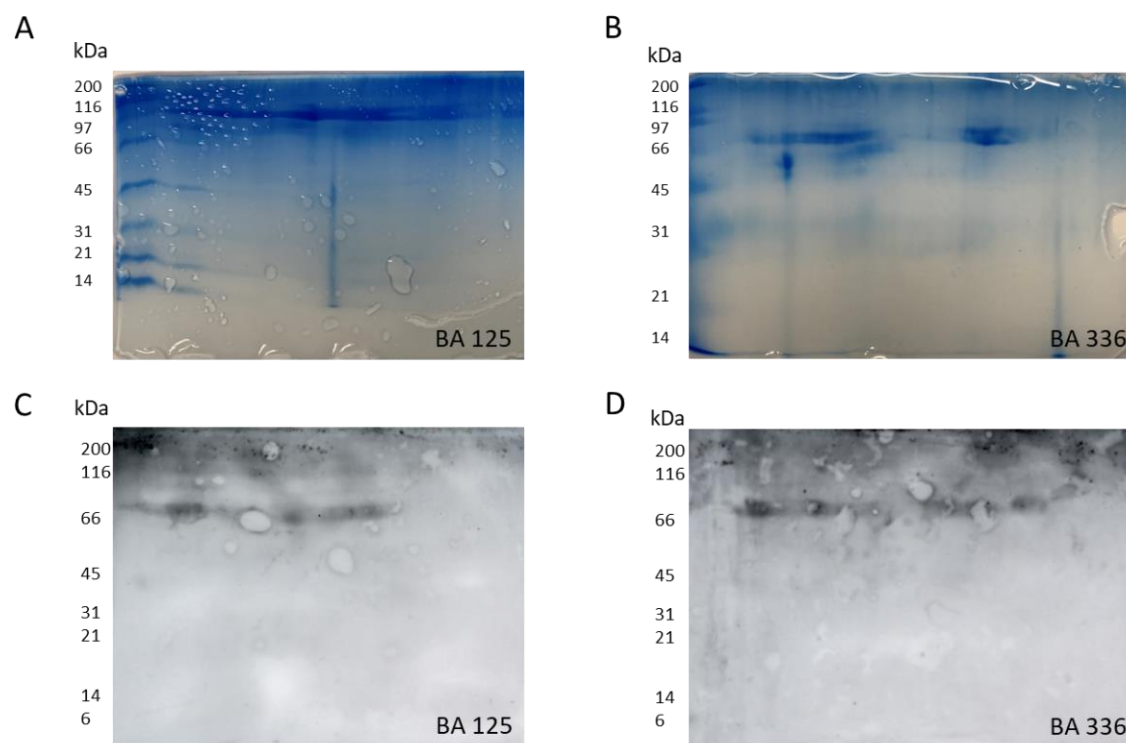


**Figura 28- Separação das proteínas das VEs de *L. amazonensis* por eletroforese bidimensional.** As VEs das estirpes BA125 (A) e BA 336 (B) de *L. amazonensis* foram submetidas a eletroforese bidimensional. As *strips* de 7cm com gradiente de pH 4 a 7 foram hidratadas com 190µg de proteínas. Em seguida, foram submetidos a focalização isoeétrica (IEF), eletroforese, fixação e coloração com Comassie Blue G250. O padrão de massa molecular encontra-se representado no lado esquerdo do gel.

#### 4.16 – As proteínas das VEs de massa molecular elevada possuem imunorreatividade ao soro de humanos portadores de LTA

Após eletroforese bidimensional, dois dos quatro géis foram usados para Western blot e pesquisa de imunorreatividade das proteínas das VEs com soro de humanos portadores de LTA.

Os géis usados como controle de eletroforese, corados com Comassie Blue G250 evidenciaram a presença de *spots*, distribuídos de forma semelhante entre as estirpes BA125 e BA336, mais concentrados entre os marcadores de massa molecular 66 e 97kDa (Fig. 29, A e B). Na pesquisa de imunorreatividade, as proteínas de massa molecular elevada (entre 66 e 116kDa) reagiram com os anticorpos do soro utilizado (Fig. 29 C e D)



**Figura 29– Eletroforese bidimensional de VEs de *L. amazonensis* e Western blot com soro de humanos portadores de LTA.** Após eletroforese bidimensional, os géis das VEs das estirpes BA125 (A) e BA336 (B) foram corados com Comassie Blue G250. As proteínas das VEs das estirpes BA125 (C) e BA336 (D) foram transferidas para membranas de nitrocelulose, incubadas com soro de humanos portadores de LTA (1:100) e com anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:5000). A reação de quimioluminescência foi capturada pelo aparelho ImageQuant™ LAS500 e as imagens adquiridas pelo sistema de câmera digital CCD.

## 5 – Discussão

As VEs fazem parte de um sistema de interação entre as células que as liberam e o microambiente onde atuam. Funcionam como transportadores de moléculas que exercem um papel crucial em processos como inflamação, proliferação celular e resposta imune. Este mecanismo de transporte e interação podem ser utilizados para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (Santos *et al*, 2021).

A purificação de VEs produzidas por parasitas da espécie *L. amazonensis* demonstra que os promastigotas mantidos *in vitro* produzem VEs pequenas (<200nm) e médias (acima 200nm). Os três métodos de recuperação de VEs aplicados neste estudo foram eficazes, embora houvesse variação entre eles, em relação à quantidade de partículas recuperadas. O método que utilizou colunas de gel, que retém partículas e permite a eluição da solução contendo VEs apresentou o melhor rendimento.

No último consenso da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), foi recomendado que para a purificação de VEs de cultura celular não sejam utilizados suplementos do meio de cultura que contenham VEs. Se esta condição não for possível, recomendam a utilização de suplementos depletados de vesículas desde que os métodos e resultados sejam detalhados (Théry *et al*, 2018). Como a não suplementação do meio de cultura de *L. amazonensis* com FBS reduz muito a viabilidade dos parasitas e compromete a liberação das VEs, a opção pela utilização do FBS *exofree* (FBS depletado de VEs) foi a melhor alternativa para que se mantivessem os promastigotas em meio de cultura por 72 horas, garantindo que estavam viáveis e produzindo vesículas. E de facto foi possível visualizar promastigotas de *L. amazonensis* com morfologia normal a segregar VEs.

A confirmação da presença de VEs de *Leishmania* spp. é essencial para a validação dos estudos. Por isso, uma combinação de métodos de deteção é a recomendação para essa comprovação. A quantificação das vesículas, a forma, o tamanho e a concentração, bem como a quantidade de células que as produziram devem ser descritos. A análise de nanopartículas e a dosagem de proteínas são os métodos quantitativos mais utilizados, embora nenhum deles, isoladamente, seja exclusivo para a detecção de VEs. A comprovação da presença de proteínas específicas do tipo celular

analisado, incluindo pelo menos, uma proteína transmembrana, também é um critério recomendado. Além destes, a obtenção de imagens por técnicas complementares é o terceiro critério para confirmação da presença das VEs (Théry *et al*, 2018).

Neste estudo, a confirmação da obtenção de VEs nas culturas de *L. amazonensis* se deu pela combinação dos seguintes métodos: detecção de proteínas de *Leishmania* spp. (gp63 e HSP70) por imunorreação; análise da morfologia, tamanho e densidade das nanopartículas, por NTA; e aquisição de imagens para análise de morfologia e tamanho, através de MEV e MET. Dessa forma, a utilização de VEs nas análises da interação com MØ e com anticorpos (soro de camundongos infectados e soro de humanos portadores de LTA) foi validada.

O rendimento proteico médio na purificação de VEs dos sobrenadantes de cultura de *L. amazonensis*, através da utilização das colunas de gel, foi de 29,5mg de proteínas provenientes de  $5,4 \times 10^8$  parasitas, durante 72 horas de período de vesiculação. Os estudos de interação das VEs com MØ utilizaram uma média de 1,4 e 0,7mg de proteínas. Em paralelo,  $6 \times 10^5$  promastigotas interagiram com os MØ durante 24 horas. Esta quantidade de parasitas produziria, teoricamente, cerca de 32µg de proteínas. Portanto, ao interpretar os resultados da interação das VEs com MØ, há que se considerar que, muito provavelmente, a quantidade de proteínas de vesículas a que os MØ foram expostos nas placas é consideravelmente maior que a quantidade teoricamente produzida pelos parasitas colocados nas mesmas condições.

A estimulação, *in vitro*, de MØ murinos com VEs, resultou na produção considerável de ureia pelos MØ. Porém, em situação idêntica, a exposição dos MØ a promastigotas de *L. amazonensis* não teve o mesmo efeito. É sabido que MØ ativados pela via alternativa (M2) aumentam a produção de ureia e ornitina, utilizadas na biossíntese de poliaminas, o que é benéfico para o parasita e promove o crescimento das formas amastigotas (Naderer *et al*, 2008). Recentemente, um estudo realizado em biópsias de lesões cutâneas provocadas por espécies neotropicais de *Leishmania* identificou uma predominância da polarização para o perfil M2 em lesões provocadas por *L. amazonensis* (Pacheco *et al*, 2021). Em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* com histologia caracterizada pela reação exsudativa celular (ECR), também foi identificada a predominância do perfil anti-inflamatório M2 e evolução das lesões para a cronicidade (Silva *et al*, 2019). Dessa forma, tanto as VEs como a infecção *in vivo* parecem exercer um efeito importante na polarização dos MØ, aumentando a população de MØ-M2,

permitindo o crescimento das formas amastigotas e a sobrevivência dos parasitas no hospedeiro.

O perfil anti-inflamatório dos MØ estimulados por VEs e expostos a promastigotas de *L. amazonensis*, é confirmado pela acentuada inibição da produção de IL-1 $\beta$ . A considerável diminuição de MØ produtores de IL-1 $\beta$ , associada à produção de ureia, indicam que as VEs da espécie *L. amazonensis* influenciam a polarização dos MØ no fenótipo M2, que é anti-inflamatório e benéfico para a sobrevivência do parasita e para o estabelecimento de uma infecção crônica, evitando reações pró-inflamatórias.

Os MØ classicamente ativados (MØ-M1) constituem a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos intracelulares. Funcionalmente, são responsáveis pela eliminação de parasitas intracelulares, através da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Atri *et al*, 2018). Os MØ-M1 são ativados pela presença de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou por lipofosfoglicanos (LPG) de várias espécies de *Leishmania*. (Ibraim *et al*, 2013) e produzem citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da IL-1 $\beta$ . Esta citocina é um importante mediador inflamatório em pacientes portadores de LTA. Entretanto, já é bem estabelecido que diferentes espécies de *Leishmania* ativam a resposta imune de diferentes maneiras. Por isso, o espectro clínico e imunopatológico de LTA é tão variado (Pacheco *et al*, 2021).

Num estudo prévio efetuado *in vitro*, VEs de promastigotas e amastigotas de *L. infantum* não causaram alterações na produção de IL-1 $\beta$  por MØ humanos (Castelli *et al*, 2019). Mas outro estudo, também efetuado *in vitro*, verificou que a exposição de MØ humanos a parasitas de *L. major* causou aumento da produção de IL-1 $\beta$  (Patil *et al*, 2018). Células dendríticas infectadas com *L. amazonensis* apresentaram um fenótipo anti-inflamatório, com redução da produção de IL-1 $\beta$ , numa regulação epigenética e transcricional relacionada com o complexo proteico NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (Lecoeur *et al*, 2020). Recentemente, MØ estimulados, *in vitro*, por VEs de *L. amazonensis* tiveram um aumento na expressão de IL-6 e IL-10. Esta última citocina tem um papel anti-inflamatório e regulador, contribuindo para a sobrevivência do parasita e a cronicidade da doença (Barbosa *et al*, 2018). Thorstenberg *et al* (2020) verificaram, em um modelo experimental de proposta terapêutica, com infecção de MØ por *L. amazonensis*, que a ativação do receptor P2Y2R (um receptor purinérgico), através do tratamento com trifosfato de uridina (UTP) induz a ativação da caspase-1 e,

consequentemente, o aumento da produção de IL-1  $\beta$ , conferindo proteção à infecção. A sinalização IL-1 $\beta$ /IL-1R é crucial para uma resposta imune protetora, mediada pelo receptor P2Y2R. Estes estudos ilustram a variação no efeito sobre a produção de IL-1 $\beta$  causada por diferentes espécies de *Leishmania*.

No presente estudo, a expressão de moléculas MHC II e MHC I por M $\phi$  murinos estimulados por VEs ou por promastigotas de *L. amazonensis* manteve-se similar a níveis basais. No entanto, a estimulação pelo extrato antigênico causou a inibição da expressão de moléculas MHC I e MHC II.

A inibição da expressão das moléculas MHC I pode ser devido à maior concentração de gp63 neste extrato. De facto, os resultados do teste de *dot blot* realizados para pesquisa de gp63 nos extratos das VEs e nos extratos de antígenos totais foram positivos. Contudo, a intensidade da quimioluminescência foi maior nos extratos antigênicos. Possivelmente, a intensidade do sinal de quimioluminescência reflete, proporcionalmente, a quantidade de proteínas aderidas à membrana de nitrocelulose. Isto sugere que a concentração de gp63 no extrato de antígenos totais era maior do que nas VEs. A apresentação de antígenos de *Leishmania* às células T CD8<sup>+</sup>, através de moléculas MHC I é inibida pela gp63 (Matheoud *et al*, 2013), uma proteína de membrana de *Leishmania*, presente também nas VEs da *L. amazonensis*, como verificado no nosso estudo. No estágio inicial da infecção dos M $\phi$ , a gp63 inativa a VAMP8, uma proteína de membrana dos M $\phi$ , envolvida no processo de fagocitose, alterando o pH do fagossoma. Essa alteração de pH influencia diretamente a atividade proteolítica e o processamento antigênico que conduz à redução da expressão das moléculas MHC I, resultando na reduzida ativação das células T citotóxicas, responsáveis pela destruição das células infectadas. Este processo é considerado mais uma forma de subversão da apresentação antigênica pelos parasitas de *Leishmania* spp. (Matheoud *et al*, 2013).

Os M $\phi$ , enquanto APCs, ativam a resposta imune adaptativa através da apresentação de proteínas de *Leishmania* aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> através do MHC II. Porém, os M $\phi$  também apresentam antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> através do MHC I. A interferência nos mecanismos de apresentação de antígenos, através da inibição da expressão das moléculas MHC, constitui um dos métodos de evasão do parasita aos efeitos nefastos do sistema imune do hospedeiro (Matheoud *et al*, 2013). Já foi demonstrado em modelo experimental, que moléculas MHC II de M $\phi$  infectados por

formas amastigotas de *L. amazonensis* e estimulados com IFN- $\gamma$  concentram-se no vacúolo parasitóforo. Embora a expressão inicial de MHC II fosse elevada, a internalização e degradação dessas moléculas pelas formas amastigotas tem um efeito desestabilizador da apresentação antigênica aos linfócitos T. A concentração de moléculas MHC II no fagossoma é reconhecido como uma estratégia de sobrevivência do parasita, através da subversão dos mecanismos de apresentação antigênica e a não ativação da resposta imunitária adaptativa (Antoine *et al*, 1999).

A interação de VEs de *L. mexicana* com M $\phi$  murinos conduziu à rápida (cerca de 24 horas) inibição da expressão de moléculas MHC I. A modulação negativa dos mecanismos de apresentação de antígenos limita a capacidade funcional dos M $\phi$  em ativar a resposta imune adaptativa. Entretanto, também não detetaram alteração na expressão de moléculas MHC II (Soto-Serna *et al*, 2020). Da mesma forma, a expressão de MHC II em M $\phi$  expostos às VEs de *L. infantum* manteve-se em níveis basais (Pérez-Cabezas *et al*, 2018).

No presente estudo, a presença da proteína HSP70 também foi comprovada nas VEs de *L. amazonensis*. Esta é uma proteína de choque térmico (*heat shock protein*-HSP), da família das chaperonas. Em *Leishmania* spp. esta proteína confere resistência e proteção aos parasitas, pois quando são introduzidos nos mamíferos e fagocitados pelos M $\phi$ , são submetidos a choque térmico, isto é, passam de temperatura ambiente (24-26 °C) para cerca de 37°C, e têm de enfrentar outros elementos defensivos dos M $\phi$ , como, por exemplo, o estresse oxidativo. Estas proteínas também têm sido associadas à resistência do parasita aos antimoniais pentavalentes (Shonhai *et al*, 2011).

A análise dos resultados obtidos com a eletroforese das proteínas das VEs revelou que a maioria das frações proteicas possui massa molecular entre 48 e 93 kDa. Contudo, o perfil proteico variou entre as estirpes analisadas. Esta variação das frações proteicas entre as estirpes de *L. amazonensis* pode estar relacionado com a presença de formas isoméricas ou modificações pós-traducionais de uma determinada proteína ou até mesmo diferença de concentração de proteínas, relacionada com o número de passagens dos parasitas em cultura.

O resultado da eletroforese bidimensional, realizada nas VEs da estirpe BA125 e BA336, mostrou um perfil semelhante entre elas. Ao compararmos a 2-DE de extrato de antígenos totais de *L. amazonensis*, já descrita na literatura (Lima *et al*, 2016) e a das

VEs, realizada neste estudo, nota-se que a variedade de proteínas, representada pelo número de bandas proteicas, é menor (cerca de um terço) nas VEs.

A análise das proteínas das VEs por eletroforese bidimensional permite uma melhor avaliação de sua variedade, uma vez que as proteínas são separadas por massa molecular e ponto isoeletrico (duas dimensões). Para a identificação de proteínas em espectrometria de massa, a utilização da técnica de eletroforese bidimensional também é mais adequada, uma vez que há menor sobreposição de proteínas. O protocolo experimental utilizado para a focalização isoeletrica das *strips* contendo extrato proteico das vesículas foi, inicialmente, o mesmo para extrato proteico total de parasitas do gênero *Leishmania*. Entretanto, foi necessário adaptar o protocolo, aumentando o período de corrente inicial de 500V, até que a etapa de corrente de mais alta voltagem fosse atingido. Este fato pode ser explicado pela alta concentração lipídica nas VEs, o que dificulta a passagem da corrente elétrica. A constituição lipídica das VEs já foi extensivamente estudada. Em geral, a composição das VEs compartilha características da membrana da célula de origem (Abels *et al*, 2016).

A antigenicidade das proteínas das VEs de *L. amazonensis* foi demonstrada, neste estudo, através das reações de Western blot, utilizando soro hiper imune de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* e soro de humanos portadores de LTA. Ambos reagiram positivamente a algumas proteínas das VEs. As reações diferenciaram entre as estirpes testadas (M2269, BA125 e BA336).

Uma banda proteica da estirpe M2269, com massa molecular com cerca de 94kDa, reagiu fortemente ao soro de BALB/c infectado com *L. amazonensis*. Esta fração proteica foi identificada no PAGE ainda que evidenciasse, após coloração, baixa intensidade, quando comparada com outras bandas presentes de diferentes massas moleculares, o que aponta para uma fração proteica com baixa concentração. Quando testadas com o soro humano, a reação também foi com uma banda única, de provável massa molecular em torno de 50kDa. Uma banda de cerca de 55kDa com elevada concentração foi identificada no PAGE das VEs da estirpe M2269. É possível que a banda proteica reconhecida pelos anticorpos do soro do indivíduo portador de LTA e a fração proteica correspondam ao mesmo antígeno.

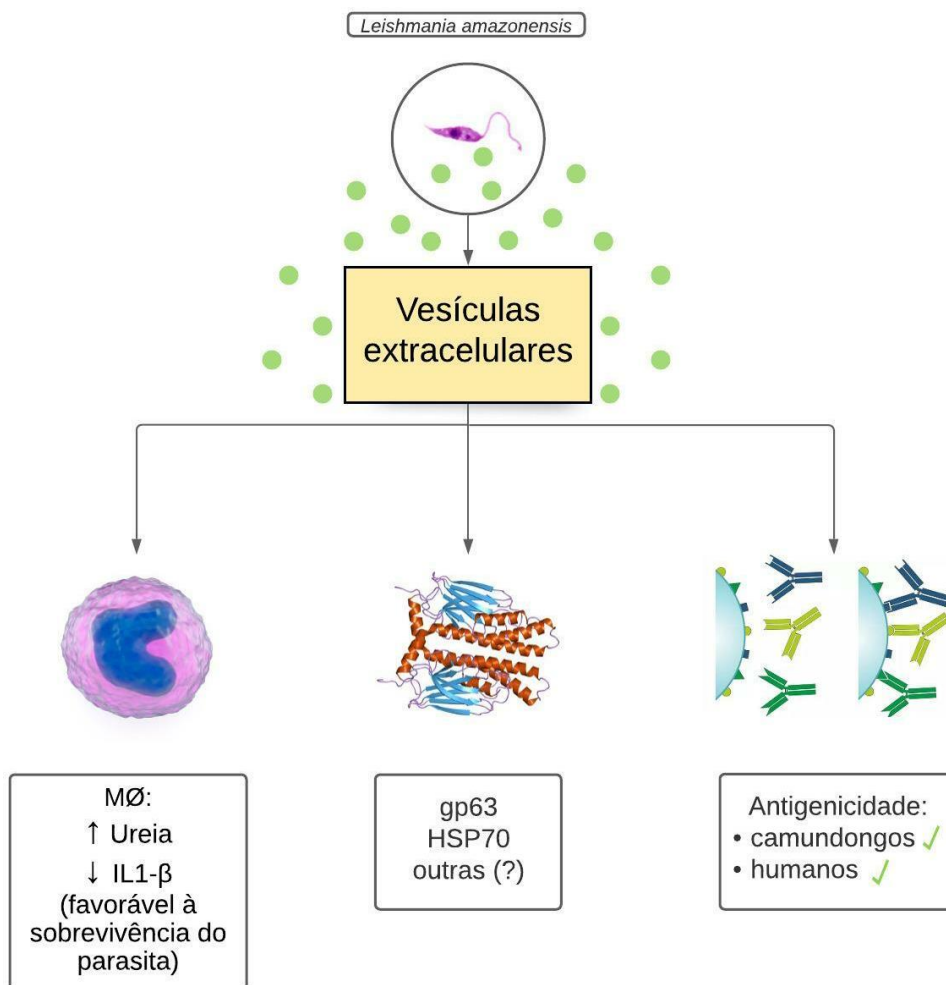
As VEs obtidas das estirpes BA125 e BA336, apresentaram um perfil semelhante de bandas no SDS-PAGE, nos *spots* do gel 2-DE, na reatividade ao soro de camundongos

e ao soro humano. Entretanto, tiveram uma pequena diferença de reatividade ao soro humano, no Western blot do gel convencional. Apesar de duas bandas de massa molecular semelhantes reagirem ao soro, cada estirpe apresentou uma banda reativa em posições diferentes. O estudo de proteômica, associado a esta pesquisa de imunorreatividade pode validar possíveis diferenças.

Estudos de imunoproteômica, seguido de análise bioinformática, identificaram diversas proteínas sorologicamente reativas de *Leishmania* spp. Proteínas de extratos totais de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* reativas ao soro de cães portadores de leishmaniose foram identificadas. Seis proteínas eram exclusivas de *L. amazonensis* e correspondiam à metalo-peptidase, proteína dissulfeto isomerase (PDI) de 5kDa, proteína 78 reguladora da glicose (78kDa *glucose-regulated protein - Grp78*), S-adenosil-L-homocisteína hidrolase, as putativas subunidades  $\beta$  de ATPase e cadeia  $\epsilon$  da ATP sintase. Duas proteínas comuns a *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram identificadas como  $\alpha$ -tubulina e a proteína mitocondrial *Heat shock 70-related protein 1*. A proteína HSP70 foi identificada nas três espécies e em diferentes *spots* nos géis bidimensionais, sugerindo que esta proteína possui diferentes formas isoméricas e/ou sofre modificações pós-traducionais (Lima *et al*, 2016). A antigenicidade das proteínas de *Leishmania* cultivadas *in vitro* diminui conforme o número de passagens da cultura. Magalhães *et al* (2014), verificaram que 37 proteínas reativas do extrato total de parasitas de *L. amazonensis* tiveram redução da expressão, enquanto que 19 proteínas mostraram aumento significativo da expressão, ao longo das passagens das culturas. Esta variação deve ser considerada nos estudos sobre estas proteínas e suas interações.

O conhecimento de antígenos reativos de *L. amazonensis* possibilita o desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico, principalmente no caso da leishmaniose cutânea, uma vez que a resposta imune nestas formas clínicas não visceralizantes é reconhecida por produzir baixos níveis de anticorpos circulantes (Lima *et al*, 2016). Além disso, essas proteínas são possíveis alvos para tratamento e prevenção, se for demonstrado a associação destas com a modulação da resposta imune do hospedeiro. Assim, as perspectivas para novos estudos incluem a análise proteômica das proteínas reativas com soro de hospedeiros definitivos de *L. amazonensis*, como canídeos e humanos, para o desenvolvimento de possíveis tratamentos e prevenção através de imunidade ativa.

6 - Conclusões



**Figura 30– Atividade e composição de VEs de *L. amazonensis*.** – As VEs purificadas a partir de meio de cultura de promastigotas exercem efeito em MØ murinos (*in vitro*), dirigindo os MØ para o fenótipo anti-inflamatório M2. Transportam proteínas idênticas aos antígenos parasitários que induzem a produção de anticorpos no soro de humanos portadores de LTA e no soro de camundongos infectados por *L. amazonensis*. Das proteínas identificadas, a gp63 provavelmente localiza-se na membrana das VEs e a HSP70 deve fazer parte da carga das VEs.

As VEs de *L. amazonensis* transportam moléculas que agem no microambiente, exercendo um papel importante na sobrevivência e adaptação do parasita ao meio intracelular do hospedeiro. VEs de *L. amazonensis* (Fig.30):

- Não promovem ambientes pro-inflamatórios e evitam estimular a apresentação antigênica, favorecendo a infecção e a sobrevivência do parasita;

## Conclusões

- As VEs possuem proteínas reconhecidas por anticorpos de soro hiperimune de camundongos infectados por *L. amazonensis* e soro de humanos portadores de LTA, indicando, de forma indireta, correspondência entre os antígenos parasitários e as VEs;
- Possuem as proteínas gp63, glicoproteína com atividade proteolítica muito abundante na superfície do parasita e provavelmente presente na membrana das VEs;
- Possivelmente transportam a HSP70, proteína intracelular com funções de proteção contra choques térmicos;
- Possuem outras proteínas em sua constituição, a serem identificadas e que devem exercer papel importante no microambiente onde se encontram, com a finalidade de proporcionar um ambiente favorável à manutenção e replicação de *Leishmania* spp.

**7 – Bibliografia**

Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA Cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(3):301-12. doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.

Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol.* 2003; 17(1):1-18. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00420.x.

Antoine JC, Lang T, Prina E, Courret N, Hellio R. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci.* 1999;112(15):2559-70.

Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1801. doi: 10.3390/ijms19061801.

Barbosa FMC, Dupin TV, Toledo MDS, Reis NFDC, Ribeiro K, Cronemberger-Andrade A, Rugani JN, De Lorenzo BHP, Novaes E Brito RR, Soares RP, Torrecilhas AC, Xander P. Extracellular vesicles released by *Leishmania (leishmania) amazonensis* promote disease progression and induce the production of different cytokines in macrophages and b-1 cells. *Front Microbiol.* 2018; 9:3056. doi: 10.3389/fmicb.2018.03056.

Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 1994;79(2):215-8. doi: 10.1006/expr.1994.1084.

Biriken D, Yazıhan N, Yılmaz Ş. Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times. *Mikrobiyol Bul.* 2018;52(2):147-155. doi: 10.5578/mb.66745.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da saúde; 2017. 189 p.

Carvalho A.K., Silveira T.F., Passero L.F. D., Gomes C.M.C., Corbett P.E.C., Laurenti D.M., 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite immunology*, 34: 395–403.

Carvalho, JP. *et al.* Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021; 54:e04542020. doi: 10.1590/0037-8682-0454-2020.

Castelli G, Bruno F, Saieva L, Alessandro R, Galluzzi L, Diotallevi A, Vitale F. Exosome secretion by *Leishmania infantum* modulate the chemotactic behavior and cytokine expression creating an environment permissive for early infection. *Exp Parasitol.* 2019; 198:39-45. doi: 10.1016/j.exppara.2019.01.014.

Charmot G, Rodhain F. Les leishmanioses viscérales [Visceral leishmaniasis]. *J R Coll Physicians Lond.* 1975 Oct;10(1):72-8. French.

Chaves MM, Lee SH, Kamenyeva O, Ghosh K, Peters NC, Sacks D. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. *PLoS Pathog.* 2020; 16(11):e1008674. doi: 10.1371/journal.ppat.1008674.

Christensen SM, Belew AT, El-Sayed NM, Tafuri WL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 3(3):e0007152. doi: 10.1371/journal.pntd.0007152.

Comfort N, Cai K, Bloomquist TR, Strait MD, Ferrante AW Jr, Baccarelli AA. Nanoparticle tracking analysis for the quantification and size determination of extracellular vesicles. *J Vis Exp.* 2021;(169):10.3791/62447. Published 2021 Mar 28. doi:10.3791/62447

Dedavid, Berenice Anina. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras - materiais poliméricos, metálicos e semicondutores / Berenice Anina

Dedavid, Carmem Isse Gomes, Giovanna Machado. – Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 6 p. ISBN: 978-85-7430-70

Ferraz R., Bertho A.L., 2013. Citometria de Fluxo: Cell sorting - fundamentos e aplicações. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (cell sorting), IOC, FIOCRUZ, 2013.

Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018; 154(2):186-195. doi: 10.1111/imm.12910.

Gabriel A, Valério-Bolas A, Palma-Marques J, Mourata-Gonçalves P, Ruas P, Dias-Guerreiro T, Santos-Gomes G. Cutaneous leishmaniasis: the complexity of host's effective immune response against a polymorphic parasitic disease. *J Immunol Res*. 2019; 2019:2603730. doi: 10.1155/2019/2603730.

Gachet-Castro C, Freitas-Castro F, Gonzáles-Córdova RA, da Fonseca CK, Gomes MD, Ishikawa-Ankerhold HC, Baqui MMA. Modulation of the host nuclear compartment by *Trypanosoma cruzi* uncovers effects on host transcription and splicing machinery. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:718028. doi: 10.3389/fcimb.2021.718028.

Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015; 15:577. doi: 10.1186/s12885-015-1546-9.

Grimaldi G Jr. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1982;77(2):195-215. Portuguese. doi: 10.1590/s0074-02761982000200010.

Grubbs H, Kahwaji CI. Physiology, active immunity. 2020. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.

Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania*

*infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. Parasit Vectors. 2013; 6:54. doi: 10.1186/1756-3305-6-54.

Júnior RQB, Martins GR, Barroso IC, Marinho RC, Aguiar TDF, Teixeira MFS. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry as proteomic tools applied to the definition of protein markers associated with reproductive efficiency goats. Acta Veterinaria Brasilica, v.7, n.2, p.100-112, 2013.

Kaur BP, Secord E. Innate Immunity. Pediatr Clin North Am. 2019; 66(5):905-911. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.011.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(4):702-3. doi: 10.1016/0035-9203(87)90468-8.

Lecoeur H, Rosazza T, Kokou K, Varet H, Coppée JY, Lari A, Commère PH, Weil R, Meng G, Milon G, Späth GF, Prina E. *Leishmania amazonensis* subverts the transcription factor landscape in dendritic cells to avoid inflammasome activation and stall maturation. Front Immunol. 2020; 11:1098. doi: 10.3389/fimmu.2020.01098.

Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. Clin Exp Immunol. 2008; 153(2):221-30. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03687.x.

Lima BS, Fialho LC Jr, Pires SF, Tafuri WL, Andrade HM. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. Vet Parasitol. 2016; 223:115-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.04.019.

Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. Clin Exp Immunol. 2017; 188(2):183-194. doi: 10.1111/cei.12952.

Machado GU, Prates FV, Machado PRL. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol*. 2019; 94(1):9-16. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198775.

Machado-Coelho GL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhães PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Jan;99(1):55-61. doi: 10.1016/j.trstmh.2003.08.001.

Magalhães RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Manso Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen RA, Coelho EA. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(4):e2764. doi: 10.1371/journal.pntd.0002764.

Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-434. doi:10.4103/1947-2714.100998

Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, Suarez JA. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. *Curr Trop Med Rep*. 2021;8(2):121-132. doi: 10.1007/s40475-021-00232-7.

Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, Gagnon E, Desjardins M, Descoteaux A. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe*. 2013; 14(1):15-25. doi: 10.1016/j.chom.2013.06.003.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*. 2014;107(1):7-14. doi: 10.1093/qjmed/hct116.

Mondal D, Bern C, Ghosh D, Rashid M, Molina R, Chowdhury R, Nath R, Ghosh P, Chapman LAC, Alim A, Bilbe G, Alvar J. Quantifying the infectiousness of post-kala-azar dermal leishmaniasis toward sand flies. *Clin Infect Dis*. 2019; 69(2):251-258. doi: 10.1093/cid/ciy891.

Morris SM Jr. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr.* 2016; 146(12):2579S-2586S. doi: 10.3945/jn.115.226621.

Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008; 10(2):301-8. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01096x.

Nogueira PM, de Menezes-Neto A, Borges VM, Descoteaux A, Torrecilhas AC, Xander P, Revach OY, Regev-Rudzki N, Soares RP. Immunomodulatory properties of *Leishmania* extracellular vesicles during host-parasite interaction: differential activation of TLRs and NF- $\kappa$ B translocation by dermatropic and viscerotropic species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:380. doi: 10.3389/fcimb.2020.00380.

Organização Pan-Americana da da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 2007; 56(1):45-50. doi: 10.1007/s00011-007-6115-5.

Patil T, More V, Rane D, Mukherjee A, Suresh R, Patidar A, Bodhale N, Mosser D, Dandapat J, Sarkar A. Pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) controls *Leishmania* infection. *Cytokine.* 2018; 112:27-31. doi: 10.1016/j.cyto.2018.06.033.

Pérez-Cabezas B, Santarém N, Cecílio P, Silva C, Silvestre R, A M Catita J, Cordeiro da Silva A. More than just exosomes: distinct *Leishmania infantum* extracellular products potentiate the establishment of infection. *J Extracell Vesicles.* 2018; 8(1):1541708. doi: 10.1080/20013078.2018.1541708.

Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015;10(1):111-29. doi: 10.2217/fmb.14.103.

Rosenthal, Philip. J. Protozoal and Helminthic infection. *In: McPhee, Stephen J; Papadakis, Maxine A. 2021 CURRENT Medical Diagnosis & Treatment. New York, EUA: McGraw Hill 2021, p.1555 – 1557.*

Sandoval Pacheco CM, Araujo Flores GV, Gonzalez K, de Castro Gomes CM, Passero LFD, Tomokane TY, Sosa-Ochoa W, Zúniga C, Calzada J, Saldaña A, Corbett CEP, Silveira FT, Laurenti MD. Macrophage polarization in the skin lesion caused by neotropical species of *Leishmania* sp. *J Immunol Res.* 2021; 2021:5596876. doi: 10.1155/2021/5596876.

Santos P, Almeida F. Exosome-based vaccines: history, current state, and clinical trials. *Front Immunol.* 2021; 12:711565. doi: 10.3389/fimmu.2021.711565.

Santos-Mateus D, Passero F, Rodrigues A, Valério-Bolas A, Silva-Pedrosa R, Pereira M et al. The battle between *Leishmania* and the host immune system at a glance. *International Trends in Immunity.* 2016;4:28.

Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford).* 2020; 2020:baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062

Shonhai A, Maier AG, Przyborski JM, Blatch GL. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept Lett.* 2011; 18(2):143-57. doi: 10.2174/092986611794475002.

Silva JMD, Silva HALD, Zelenski C, Souza JAM, Hueb M, Damazo AS. Analysis of macrophage subtypes and annexin A1 expression in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52:e20190361. doi: 10.1590/0037-8682-0361-2019.

Soto-Serna LE, Diupotex M, Zamora-Chimal J, Ruiz-Remigio A, Delgado-Domínguez J, Cervantes-Sarabia RB, Méndez-Bernal A, Escalona-Montaño AR, Aguirre-García MM,

Becker I. *Leishmania mexicana*: novel insights of immune modulation through amastigote exosomes. *J Immunol Res.* 2020; 2020: 8894549. doi: 10.1155/2020/8894549.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Ghossein YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC,

Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciocchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. 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. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Thorstenberg ML, Martins MDA, Figliuolo V, Silva CLM, Savio LEB, Coutinho-Silva R. P2Y2 receptor induces *L. amazonensis* infection control in a mechanism dependent on caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  secretion. *Mediators Inflamm*. 2020; 2020:2545682. doi: 10.1155/2020/2545682.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017; 6:750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.

Varela JC, Tomlinson S. Complement: an overview for the clinician. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015; 29(3):409-27. doi: 10.1016/j.hoc.2015.02.001.

Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol*. 2019; 10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.

WHO - WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, NO 25, 19 JUNE 2020 - 265–280  
<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>

Yamamoto ES, Campos BL, Laurenti MD, Lago JH, Grecco Sdos S, Corbett CE, Passero LF. 2014. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitology Research* 113: 333–339.

Zaia, Dimas A. M., Zaia, Cássia Thaís B. V. and Lichtig, Jaim. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. *Química Nova* 1998, v. 21, n. 6, pp. 787-793. ISSN 1678-7064.

Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol*. 2008; 214(2):161-78. doi: 10.1002/path.2284.

Zijlstra EE. Biomarkers in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:228. doi: 10.3389/fcimb.2019.00228.