



Universidade Federal de São Paulo
Campus Diadema



Mariana Marques Geraldo

VESÍCULAS EXTRACELULARES E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Orientadora: Profa. Patricia Xander Batista

DIADEMA

2020

MARIANA MARQUES GERALDO

VESÍCULAS EXTRACELULARES E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Xander Batista

DIADEMA

2020

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Geraldo, Mariana Marques

Vesículas Extracelulares e Sistema Imunológico / Mariana
Marques Geraldo. -- Diadema, 2020.

41 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2020.

Orientador: Patricia Xander Batista

1. Nanopartículas. 2. Exossomos. 3. Microvesículas. 4.
Leishmaniose. I. Título.

MARIANA MARQUES GERALDO

VESÍCULAS EXTRACELULARES E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Diadema, 02 de outubro de 2020.

Banca examinadora

Patricia Xander

Profa. Dra. Patricia Xander Batista
Universidade Federal de São Paulo

El Perez

Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez
Universidade Paulista

Ronni Rômulo Novaes e Brito

Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito
Centro Universitário São Camilo

AGRADECIMENTOS

Por toda a trajetória desde o ingresso da universidade até a entrega do trabalho de conclusão de curso, pessoas foram importantes e têm participação única no resultado desse processo.

Sou enormemente grata aos meus pais e ao meu irmão por sempre me incentivarem e acreditarem que eu seria capaz de alcançar meus objetivos. Agradeço por todo o investimento em minha educação, todo o amor envolvido, a paciência e cuidado durante toda minha vida.

Um agradecimento especial a minha orientadora Patricia Xander Batista pela oportunidade de aprendizado, desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional. Agradeço por todo incentivo, paciência, dedicação, compromisso e por me manter motivada durante todo o processo, me fazendo acreditar que era possível.

Agradeço aos meus amigos e familiares que foram importantes nesse processo, me apoiando e sendo pacientes em entender as ausências nos eventos programados.

E por fim, agradeço a Universidade e ao corpo docente que se mostrou estar empenhado e comprometido com o aprendizado e ensino de qualidade.

Mariana Marques Geraldo

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes. “

Marthin Luther King

RESUMO

Vesículas extracelulares são nanopartículas secretadas por quase todas as células presente em diferentes organismos (incluindo bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células de mamíferos) e têm importante papel como mediadores na comunicação célula-célula e patógeno hospedeiro. As vesículas incluem os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, diferenciadas pelo tamanho e composição e biogênese. Estudos mostraram a capacidade de vesículas extracelulares em armazenar e liberar moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e suas funções únicas relacionadas as células de origem como macrófagos e linfócitos. Trabalhos recentes mostraram que essas estruturas participam de diversos processos biológicos, da resposta imunológica, assim como no desenvolvimento de infecções e da progressão e patogênese de doenças infecciosas. Essas vesículas têm sido utilizadas para detecção, diagnóstico e prognóstico de diversas doenças. A proposta deste trabalho foi realizar revisão bibliográfica sobre a estrutura das vesículas extracelulares, sua importância, sua ação no sistema imunológico e como podem ser utilizadas para diagnóstico de doenças negligenciadas, como a leishmaniose.

Palavras chave: Nanopartículas. Exossomos. Microvesículas. Leishmaniose. Vesículas Extracelulares. Sistema Imunológico.

ABSTRACT

Extracellular vesicles are nanoparticles secreted by almost all cells present in different organisms (including bacteria, fungi, protozoa, helminths and mammalian cells) and have an important role as mediators in cell-cell communication and host pathogen. Vesicles include exosomes, microvesicles and apoptotic bodies, differentiated by size, composition and biogenesis. Studies have shown the ability of extracellular vesicles to store and release molecules such as lipids, proteins and nucleic acids and their unique functions related to cells of origin such as macrophages and lymphocytes. Recent work presented that these structures participate in several biological processes, in the immune response, as well as in the development of infections and in the progression and pathogenesis of infectious diseases. These vesicles have been used for the detection, diagnosis and prognosis of several diseases. The purpose of this work is to perform a bibliographic review on the structure of extracellular vesicles, their importance and their action on the immune system and how they can be used for the diagnosis of neglected diseases, such as Leishmaniasis.

Key Words: Nanoparticles. Exosomes. Microvesicles. Leishmaniasis. Extracellular Vesicles. Immune System.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
4. DESENVOLVIMENTO.....	11
4.1 Visão geral do sistema imunológico e das respostas imunes	11
4.1.1 Imunidade Inata	11
4.1.2 Imunidade Adaptativa	14
4.2 Vesículas Extracelulares	17
4.3 Vesículas Extracelulares e Sistema Imunológico	22
4.4 Células Apresentadoras de Antígenos	24
4.4.1 Células Dendríticas	24
4.4.2 Macrófagos	26
4.4.3 Linfócitos	28
4.4.1.1 Linfócitos Natural Killer	29
4.4.1.2 Linfócitos B e T.....	30
4.5 Diagnóstico e Vesículas Extracelulares	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é composto por diferentes órgãos, tecidos, diferentes células e moléculas capazes de desenvolver respostas coordenadas em reação a danos teciduais e a entrada de componentes estranhos ao corpo, como micro-organismos, proteínas e pequenas substâncias químicas (NICHOLSON, 2016).

As células do sistema imune são um grupo diversificado de tipos celulares e encontram-se circulantes no sangue, sistema linfático e também distribuídas em todos os tecidos (CHAPLIN, 2010). Essas células originam-se a partir de células-tronco hematopoiéticas que residem na medula óssea (CHAPLIN, 2010). Os locais onde as células linfoides são geradas e maturadas são denominados órgãos linfoides primários, sendo a medula óssea responsável por produzir tipos celulares progenitores linfoides, que posteriormente serão precursores da linhagem comprometida com as células T, B e *Natural Killer* (NK) e precursores mieloides que darão origem as linhagens de basófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC) e mastócitos, respectivamente (CHAPLIN, 2010). O desenvolvimento de células a partir de células multipotentes ocorre pela expressão coordenada de citocinas e receptores de superfície na medula óssea (CHAPLIN, 2010; NICHOLSON, 2016).

A organização anatômica das células e dos tecidos do sistema imunológico é essencial para a geração de dois tipos de resposta imunológica: a imunidade inata (também chamada de imunidade natural) e a adaptativa. Apenas a adaptativa é capaz de gerar memória imunológica (YATIM; LAKKIS, 2015).

A comunicação e a sinalização entre as células do sistema imunológico ocorrem principalmente pelo contato célula-célula e por moléculas sinalizadoras, como citocinas (XIE; TATO; DAVIS, 2013). Atualmente, sabe-se que essa comunicação pode ocorrer também por meio de vesículas extracelulares (EVs) liberadas pelas células (ROBBINS; MORELLI, 2014; TKACH; THÉRY, 2016).

EVs são um grupo heterogêneo de partículas que podem ser classificadas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, de acordo com a biogênese, tamanho e composição (THÉRY *et al.*, 2018). A composição molecular destes três subconjuntos é diferente, no entanto vários marcadores se sobrepõem e ainda não há

um marcador específico capaz de distinguir ou identificar um subconjunto de EV particular (THÉRY *et al.*, 2018).

EVs estão envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo comunicação intercelular, entrega de proteínas, lipídios e material genético a outras células (célula receptora) (ABELS; BREAKFIELD, 2016; THÉRY *et al.*, 2018). Além disso, EVs também foram associadas com o desenvolvimento e progressão de diferentes doenças, como câncer e doenças infecciosas e parasitárias (LATIFKAR *et al.*, 2019); (COAKLEY; MAIZELS; BUCK, 2015; FREITAS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2018; MACIA *et al.*, 2019). Os efeitos no sistema imunológico provindos das EVs abrangem uma ampla gama de mecanismos, incluindo ativação da resposta imunológica, imunossupressão e modulação da vigilância imunológica (ROBBINS; DORRONSORO; BOOKER, 2016; ROBBINS; MORELLI, 2014; VEERMAN *et al.*, 2019). Já foi demonstrado que células tanto da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa liberam EVs (BHATNAGAR; SCHOREY, 2007; MITTELBRUNN *et al.*, 2011; SAUNDERSON *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2013; ZITVOGEL *et al.*, 1998) e o efeito na resposta imunológica está diretamente relacionado à composição molecular das EVs e a célula alvo receptora (WEN *et al.*, 2017; ZHANG; HUBAL; KRAUS, 2020).

2. OBJETIVOS

Fazer revisão bibliográfica sobre o papel das vesículas extracelulares (EVs) liberadas por células do sistema imunológico no controle e no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção do trabalho foram realizadas buscas em repositórios de artigos científicos (Scopus, Pubmed, Medline) sobre o tema em português: “sistema imunológico” e “vesículas extracelulares” e em inglês: “immune system” e “extracellular vesicles”.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Visão geral do sistema imunológico e das respostas imunes

4.1.1 Imunidade Inata

A imunidade inata é composta por barreiras epiteliais, proteínas e células, cuja resposta é desencadeada imediatamente após o reconhecimento de estruturas não próprias, que podem estar presentes nos microrganismos, ou por moléculas expostas em tecidos danificados (GASTEIGER *et al.*, 2017). As células que fazem parte da imunidade inata compreendem ampla variedade de tipos celulares de origem mieloide (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos) e linfoide (linfócitos intraepiteliais, células *natural killer* - NK). A maioria dessas células originam-se do sistema hematopoiético, apresentam receptores de antígenos recombinados somaticamente e exercem funções antimicrobianas ou de proteção nos tecidos (CHAPLIN, 2010; GASTEIGER *et al.*, 2017).

Receptores de superfícies celulares expressos nas células da imunidade inata detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como ácidos nucleicos provenientes de vírus, proteínas, lipídeos e carboidratos encontrados em bactérias e fungos ou padrões moleculares associados a danos teciduais (DAMPs) (LIU; LIU; GE, 2017). Esses receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são importantes componentes, tendo como principais funções: reconhecimento de PAMPs e DAMPs, estimulação de fagócitos para exercer funções efetoras como fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios. Diferentes tipos de receptores já foram identificados e caracterizados, tais como: receptores semelhantes à *Toll* (TLRs), receptores do tipo domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD) (NLRs), receptores do tipo I do gene induzível pelo ácido retinóico (RIG-I) (RLRs) (MODLIN, 2012).

TLRs são glicoproteínas de membrana localizadas nas superfícies celulares ou em endossomos. Dez tipos de TLRs foram identificados em humanos, denominados TLR1 ao TLR10. Os TLRs interagem com seus respectivos PAMPs ou DAMPs como um homo- ou heterodímero junto com um co-receptor ou molécula acessória (KAWAI; AKIRA, 2010). Após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, os TLRs recrutam proteínas adaptadoras contendo domínio TIR, como MyD88 e TRIF e ativam vias de

transdução de sinal que culminam na ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e interferon tipo I que, em última análise, protegem o hospedeiro de infecção microbiana e tumores. (KAWASAKI; KAWAI, 2014). Receptores semelhantes a NOD (NLRs), classificados de acordo com sua especificidade ao ligante, reconhecem PAMPs intracelulares, de forma a iniciar a sinalização pró-inflamatória ativando a liberação de fatores de transcrição responsáveis pela resposta inflamatória (SAXENA; YERETSSIAN, 2014). Os receptores do tipo I do gene induzível pelo ácido retinóico (RLRs) são moléculas sensoras citosólicas primárias para detecção de RNA viral que geram respostas pelo reconhecimento de ácidos nucleicos de vírus e induzem a produção de interferons antivirais do tipo I. Receptores do tipo I do gene induzível pelo ácido retinóico foram identificadas três tipos, sendo o mais conhecido o RIG-1, cuja ativação gera produção de interferons tipo I, que iniciam a resposta imune inata frente a infecções virais (REHWINKEL; GACK, 2020).

Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas são células capazes de realizar eficientemente a internalização de patógenos. A fagocitose é um processo que envolve primeiramente o reconhecimento de estruturas não próprias ou danificadas por meio de receptores expressos em células fagocíticas (LIM; GRINSTEIN; ROTH, 2017). Esse englobamento de partículas ou micro-organismos ocorre por meio de extrapolações da membrana celular, conhecidas como fagossomos. No interior da célula, ocorre a maturação do fagossomo em fagolisossomo e liberação de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas proteolíticas que frequentemente resultam na morte do micro-organismo. Na maioria das vezes, a fagocitose é um processo eficiente que elimina os patógenos invasores e ajuda a manter a homeostasia (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2017).

Após a entrada de patógenos, o reconhecimento quase instantâneo dos patógenos ocorre por células e moléculas solúveis. Essas moléculas são encontradas de forma solúvel no sangue e nos fluidos extracelulares. Algumas das moléculas são responsáveis pela defesa inicial contra patógenos presentes fora das células, podendo atuar como opsoninas aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos. Além disso, os mediadores solúveis promovem respostas inflamatórias

induzindo o recrutamento de fagócitos para o local de infecção. Nesse contexto, o sistema complemento, formado por uma série de moléculas que são ativadas em cascata, desempenha um papel importante na resposta imune inata e inflamação (DAHA, 2011).

A ativação das células da imunidade inata pode gerar inflamação. O processo inflamatório, se mostra como a principal forma pela qual o sistema imunológico reage contra infecções e lesões teciduais, sendo o mais primitivo mecanismo utilizado pelo sistema imunológico (LEICK *et al.*, 2014). Nesse processo, leucócitos e proteínas plasmáticas circulantes no sangue são recrutados para o local da injúria a fim de oferecer células fagocíticas e moléculas efetoras que proporcionam bloqueio prevenindo a propagação da infecção e além de reparar os tecidos lesionados (CHAPLIN, 2010). O primeiro leucócito recrutado para o local de infecção é o neutrófilo, seguido de proteínas do sistema complemento, anticorpos e proteínas plasmáticas. Todos esses componentes geram mudanças reversíveis nos vasos e tecidos danificados, sendo observados relaxamento de músculos, vasodilatação e sinais de eritema e aumento de temperatura. Além desses sinais característicos de processos inflamatórios, observa-se aumento da pressão hidrostática que leva a alterações na permeabilidade vascular e consequente extravasamento de líquido proveniente dos tecidos, resultando em edema (LEICK *et al.*, 2014). Essas respostas são observadas em decorrência da ação de mediadores inflamatórios, que são fatores liberados ou produzidos em resposta a uma lesão celular ou tecidual. Estão inseridos nesses mediadores as aminas vasoativas como histamina (presente na forma de grânulos pré-formados em mastócitos), quimiocinas (potentes quimioatraentes de células imunológicas), citocinas, proteínas plasmáticas, componentes lisossomais e metabólitos do ácido araquidônico (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018).

Citocinas inflamatórias, produzidas por células ativadas, ativam leucócitos induzindo aumento na produção de radicais de oxigênio, liberação de histamina e proteínas citotóxicas, importantes para o processo inflamatório (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). TNF, interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) são as principais citocinas pró inflamatórias, sendo liberadas por macrófagos e mastócitos teciduais principalmente (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Os interferons (IFN) são citocinas

que tem resposta imune inata antiviral e são subdivididos em dois grupos, o tipo I composto por interferon alfa e beta ($\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$) e o tipo II, composto pelo ($\text{IFN}\gamma$), sendo os IFN do tipo I capazes de aumentar a citotoxicidade das células NK e das células T (MCNAB *et al.*, 2015).

Assim, o sistema imune inato fornece uma proteção imediata respondendo às infecções, estresses químicos e mecânicos que possam gerar distúrbios na homeostase do organismo. Além disso, essa resposta também pode induzir a ativação da imunidade adaptativa, levando a ativação de células específicas a antígenos do patógeno e a produção de anticorpos.

4.1.2 Imunidade adaptativa

O desenvolvimento da imunidade adaptativa depende das ações da imunidade inata, especialmente quando os agentes infecciosos não são eliminados pela ativação da resposta imune inata. As funções da resposta imune adaptativa são: reconhecimento de antígenos “não próprios” específicos, distinguindo-os dos antígenos “próprios”; ativação de mecanismos efetores específicos de patógenos, que eliminam patógenos específicos ou células infectadas por patógenos; e desenvolvimento de uma memória imunológica que pode eliminar rapidamente um patógeno específico em infecções subsequentes (MARSHALL *et al.*, 2018).

Os linfócitos são células da imunidade adaptativa capazes de responder de maneira específica aos antígenos. Essas células possuem ampla distribuição clonal de receptores e são capazes de gerar memória específica para antígenos (MARSHALL *et al.*, 2018). Essas populações de linfócitos podem ser subdivididas em linfócitos T e B (CHAPLIN, 2010). As células T podem ainda ser subdivididas em células T CD4^+ e T CD8^+ pela expressão de marcadores moleculares distintos (CD4 ou CD8) (PENNOCK *et al.*, 2013). Já os linfócitos B são subdivididos em B foliculares que fazem parte de linfócitos B convencionais (B-2) e linfócitos B-1a e B-1b, não convencionais, sendo seus receptores clonais compostos por imunoglobulinas (Ig) (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016). Além desses, outros subtipos de células B também foram caracterizados (TSAI *et al.*, 2019).

Os receptores de antígeno do linfócito T (TCR) reconhecem especificamente antígenos que são apresentados em uma família de moléculas da superfície celular em células apresentadoras de antígenos (APCs) que são coletivamente conhecidas como complexo principal de histocompatibilidade (MHC)(HUPPA; DAVIS, 2003, 2013). As moléculas MHC podem ser divididas em duas classes: classe I são expressas em células nucleadas e as moléculas de classe II apenas em macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (células apresentadoras de antígenos profissionais) (ROCHE; CRESSWELL, 2016). Linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados via MHC classe II enquanto linfócitos T CD8⁺ reconhecem antígenos apresentados via MHC classe I (definir melhor em português) (ROCHE; CRESSWELL, 2016). Para a ativação de células T, na etapa de apresentação de antígeno é necessária também a participação de moléculas co-estimuladoras, sinalizadoras e de adesão (ROCHE; CRESSWELL, 2016). Após o reconhecimento de antígenos, os linfócitos T passam a expressar diferentes moléculas em sua superfície e a secretar citocinas que exercem diferentes funções na imunidade adaptativa e na imunidade inata. A interleucina- 2 (IL-2) é um fator de crescimento e diferenciação para linfócitos T, expresso após ativação de linfócitos T CD4⁺ (SPOLSKI; LI; LEONARD, 2018). Receptores de IL-2 de alta afinidade são também expressos por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, bem como por outras populações de células. Assim, a resposta específica é amplificada pela interação da IL-2 com seu receptor (SPOLSKI; LI; LEONARD, 2018).

O contexto de citocinas liberadas pelas APCs durante a apresentação de antígenos leva a diferenciação de células T em subtipos distintos com características efetoras específicas. Dessa forma, foram caracterizados os seguintes subconjuntos de células T CD4⁺ efetoras: Th (T *helper*) 1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg (células T reguladoras) e Tfh (células T auxiliares foliculares) (GOLUBOVSKAYA; WU, 2016). Esses distintos perfis são induzidos por citocinas específicas: IL-12 e IFN- γ induzem diferenciação para perfil Th1; Th-2 é diferenciado na presença de IL-4; Th17 é diferenciado na presença de IL-6 e TGF-beta; Th9 precisa da presença de IL-4 e TGF-beta para sua diferenciação; IL-6 e TNF induz a diferenciação em Th22; Treg por IL-2 e TGF-beta; e Tfh são diferenciados na presença de IL-6 e IL-21 (RAPHAEL *et al.*,

2015). Cada subconjunto de Th libera citocinas específicas que podem ter funções pró ou antiinflamatórias, de sobrevivência ou de proteção. Os subconjuntos Th1, Th2, Th17 e Treg já foram bem caracterizados em relação as suas funções efetoras (RAPHAEL *et al.*, 2015).

Células Th1 são fonte importante de IFN- γ , o qual exerce várias funções como ativação de macrófagos. Assim, Th1 é importante para defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, incluindo vírus, protozoários e bactérias (BRETSCHER, 2019). As células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que atuam nas respostas contra parasitas extracelulares, incluindo helmintos, e nas respostas alérgicas (BRETSCHER, 2019). As células Th17 produzem três citocinas principais: IL-17A, IL-17F, e IL-22 e são essenciais para orquestrar as respostas imunes às bactérias extracelulares e fungos (BYSTROM *et al.*, 2019). A principal função de IL-17A e IL-17F é recrutar e ativar neutrófilos; IL-22 é uma citocina crítica para estimular células na mucosa barreiras para produzir peptídeos antimicrobianos e citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (BYSTROM *et al.*, 2019). As células Treg desempenham papéis importantes em manter a tolerância imunológica e regular a magnitude das respostas imunológicas, controlando a diferenciação e funções de T células efetoras e a ativação de APCs (SHEVYREV; TERESHCHENKO, 2020).

Linfócitos T CD8⁺ são ativados pela apresentação de antígenos restritos a moléculas MHC-I. No momento da apresentação é importante também a participação de moléculas co-estimuladoras, presentes nas células apresentadoras de antígenos e nas células T CD8⁺, e de citocinas liberadas por células Th efetoras. Células T CD8 ativadas são denominadas T citotóxicas e saem dos linfonodos, extravasam para área das células infectadas ou transformadas (células tumorais) e voltam a interagir com os complexos cognatos MHC-I. Moléculas desencadeadoras de apoptose são liberadas pelos linfócitos T citotóxicos levando à morte e eliminação das células infectadas ou transformadas (UZHACHENKO; SHANKER, 2019).

Já os linfócitos B reconhecem diretamente os antígenos via receptor de células B (BCR), composto pela imunoglobulina (Ig) de membrana (IgM) ou pela IgD e pelas moléculas Iga e Igb (LI *et al.*, 2018). Apesar de todas as moléculas de Ig apresentarem as mesmas características estruturais de base, apresentam grande heterogeneidade

na região ligante do antígeno. Após a ativação das células B convencionais, anticorpos da classe IgM, que apresentam menor afinidade, são liberados (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016). Contudo, mediante o estímulo de células Th foliculares e de células dendríticas foliculares, células B sofrem hipermutação somática (SHM) nas regiões variáveis dos genes BCR e expansão clonal, e também ocorre recombinação de troca de classe que muda a região constante da imunoglobulina de um isotipo para outro (IgG, IgA, IgE) (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; TSAI *et al.*, 2019). As células B com receptores de alta afinidade se diferenciam ainda mais em células plasmáticas (que produzem grandes quantidades de anticorpos) ou células B de memória (TSAI *et al.*, 2019). Além de anticorpos, células B (convencionais ou outros tipos) produzem diversas citocinas que atuam na ativação e na regulação do sistema imunológico (CYSTER; ALLEN, 2019). As células B-1, um subtipo de células B, não são classificadas como células linfóides. Essas células secretam grandes quantidades de IL-10 (O'GARRA *et al.*, 1992), citocina imunomoduladora com ampla atuação em diversos tipos celulares (NOVAES E BRITO *et al.*, 2019; OUYANG; O'GARRA, 2019).

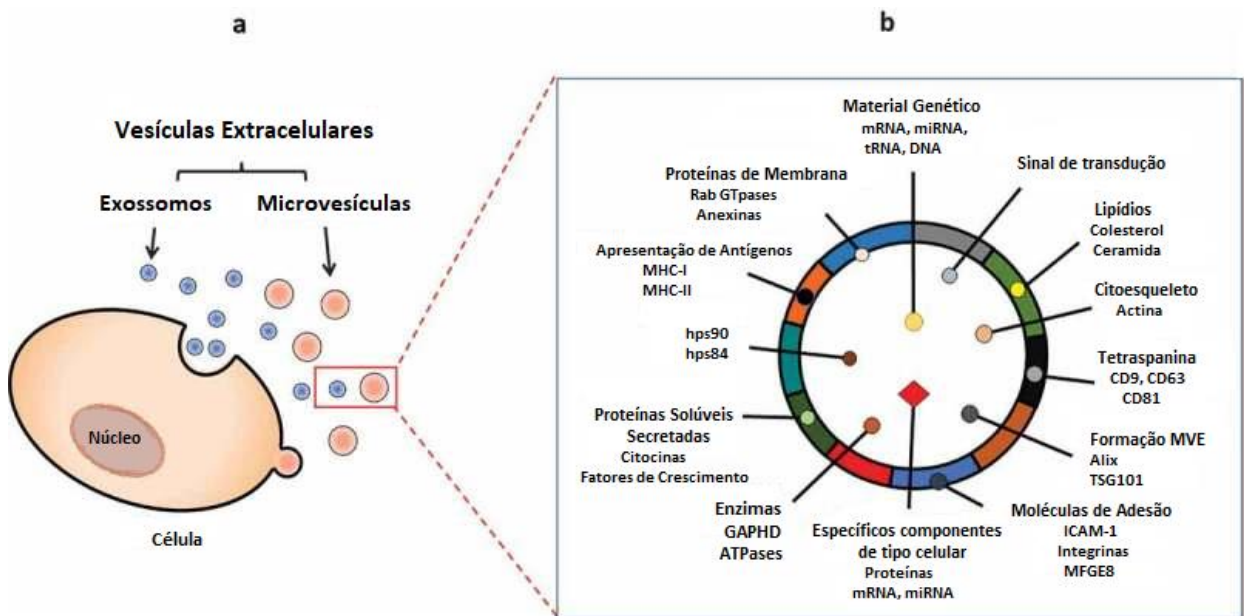
Assim, a comunicação entre as células do sistema imunológico ocorre de maneira coordenada, porém complexa, e envolve a participação de contato antígeno-célula do hospedeiro, contato célula-célula e moléculas efetoras liberadas pelas células (citocinas e quimiocinas). Atualmente sabe-se que vesículas extracelulares (EVs) liberadas por essas células também podem participar da ativação e regulação das respostas imunológicas (ROBBINS; DORRONSORO; BOOKER, 2016; ROBBINS; MORELLI, 2014). Essas EVs são liberadas virtualmente por todas as células e participam efetivamente da comunicação intercelular, levando a uma série de consequências nas células receptoras (THÉRY *et al.*, 2018). O conceito de EVs, seu papel na resposta imunológica e aplicações na terapia e diagnóstico será revisado nos itens abaixo.

4.2 Vesículas Extracelulares

Vesícula extracelular (EV) é um termo genérico utilizado para nomear partículas liberadas naturalmente por células procarióticas e eucarióticas, delimitadas por uma

bicamada lipídica e que não podem se replicar (THÉRY *et al.*, 2018). Essas partículas podem conter lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e moléculas de diferentes origens celulares e com distintas funções (Figura 1) (TKACH; KOWAL; THÉRY, 2018) (THÉRY *et al.*, 2018) (WEN *et al.*, 2017). Podem ser encontradas em fluídos biológicos como leite humano, plasma, urina, saliva, fluído cérebro espinhal e ascite (THÉRY *et al.*, 2018; TKACH; KOWAL; THÉRY, 2018).

Figura 1 – Biogênese e composição das EVs.



Fonte: WEN *et al.*, 2017. (a) EVs podem ser classificadas em: microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos, dependendo de suas vias de biogênese. (b) Composição geral, incluindo materiais genéticos, lipídios, proteínas extracelulares transmembranares (moléculas de adesão celular, tetraspanina), proteínas citosólicas, proteínas intracelulares.

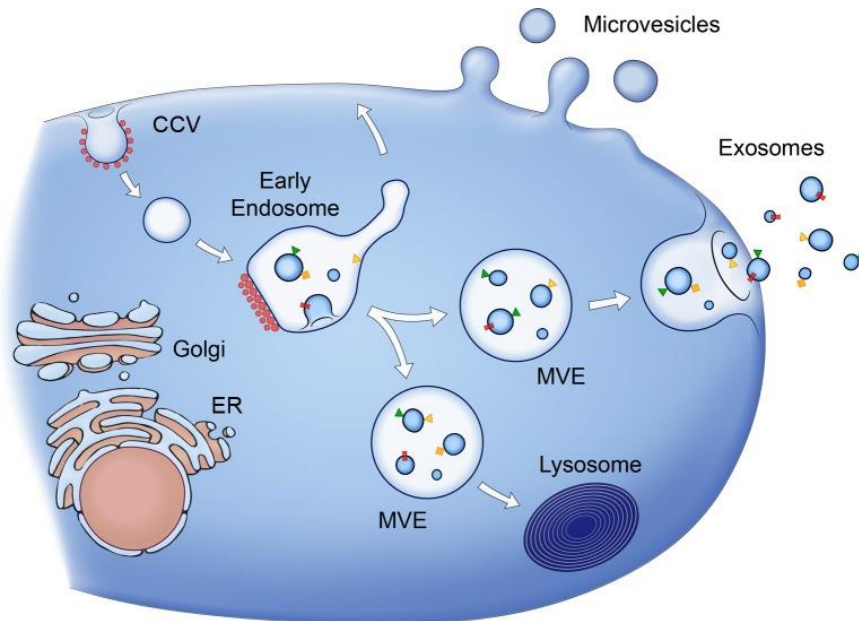
Atualmente, EVs podem ser classificadas em três categorias principais de acordo com o tamanho, conteúdo e biogênese: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (THÉRY *et al.*, 2018). Exossomos são um subtipo de EV formados pela via endossomal e que apresentam entre 30 a 150 nanômetros (nm) de diâmetro (THÉRY *et al.*, 2006). A biogênese de exossomos consiste na formação de brotamento interno da membrana dos endossomos iniciais, que amadurecem em corpos multivesiculares (MVBs) (KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). Os endossomos iniciais originam-se a partir do brotamento interno da membrana plasmática da célula.

Ambos, endossomos e MVBs estão envolvidos nas funções endocíticas e no tráfego do material intracelular tais como: classificação, reciclagem, armazenamento, transporte e liberação de proteínas (KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). A Figura 2 representa o esquema de formação de exossomos dentro do citoplasma até atingir o ambiente extracelular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

O destino e os mecanismos do tráfego intracelular de MVBs ainda não está bem esclarecido. MBVs podem ser enviados para degradação por lisossomos ou se fundem à membrana plasmática para liberar exossomos por exocitose. No entanto, sabe-se que proteínas ESCRT, Alix, TSG101, HSC70 e HSP90 β e proteínas da família da tetraspanina (CD63, CD9 e CD81) participam do processo de formação de exossomos (KOWAL *et al.*, 2016). Apesar de exossomos apresentarem enriquecimento nessas moléculas, atualmente sabe-se que não são marcadores exclusivos de exossomos podendo ser encontrados em microvesículas e corpos apoptóticos (THÉRY *et al.*, 2018).

Microvesículas (MVs) são formadas por brotamento na parte externa da membrana plasmática. Dependendo do tipo celular, as microvesículas mostram-se repletas de proteínas de superfície celular como Mac-1, metaloproteinases da matriz (MMPs) e glicoproteínas como P-selectina e integrinas, que já foram utilizadas como marcadores para microvesículas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Embora as microvesículas e os exossomos sejam estruturalmente semelhantes, eles diferem em relação ao tamanho, composição lipídica, origem celular e conteúdo, embora ainda não existam marcadores específicos (Figura 2) (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). MVs possuem diâmetro de 100 à 1000 nm e são liberadas por brotamento na membrana plasmática, sendo compostos de moléculas bioativas capazes de estimular complexos de sinalização, transferir receptores de membrana, proteínas e carrear antígenos como derivados de vírus (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). A via molecular de formação de MVs não é bem compreendida. Contudo, alguns estudos apontam a participação de componentes do citoesqueleto (como actina e microtúbulos) cinesinas e miosinas e SNAREs (CAI; REINISCH; FERRO-NOVICK, 2007).

Figura 2 - Esquema de formação de exossomos e microvesículas



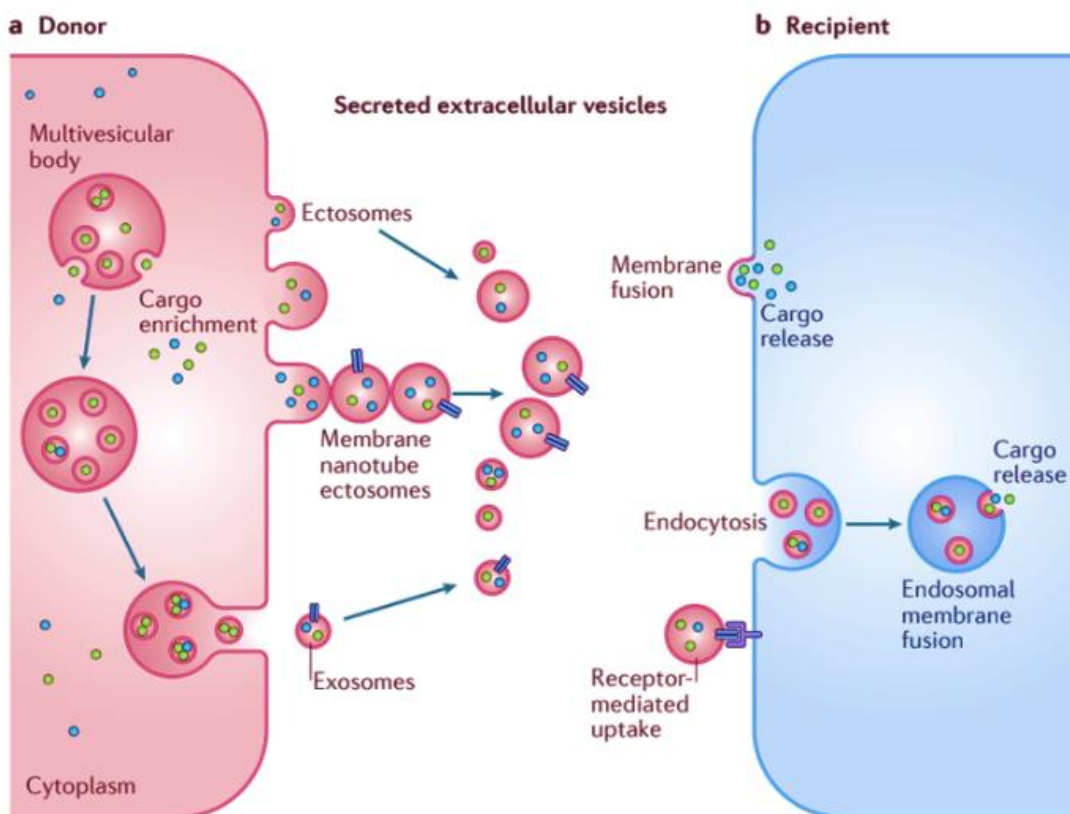
Fonte: RAPOSO; STORVOGEL, 2013. As microvesículas (MVS) surgem pelo brotamento de vesículas enquanto os exossomos são pequenas vesículas de diferentes tamanhos formados pelo brotamento de endossomos precoces. São liberados pela fusão de corpos multivesiculares (MVEs) com a membrana plasmática. Outros MVEs também podem se fundir com os lisossomos. Os ligantes e proteínas associadas as membranas são identificados como triângulos, quadrados e retângulos coloridos na figura.

EVs liberadas no espaço extracelular podem ser internalizadas por células adjacentes, com pouca distância da célula de origem, ou podem se espalhar pela circulação sistêmica e ser absorvidas por tecidos distantes (SZEMPRUCH *et al.*, 2016). Na célula receptora, a sinalização mediada por EVs pode ocorrer por contato direto entre as EVs e a membrana celular, por fusão das duas membranas, por receptores presentes na superfície celular ou por endocitose (RAPOSO; STORVOGEL, 2013). A interação entre célula alvo e EVs está ilustrada na Figura 3 (SZEMPRUCH *et al.*, 2016).

Após ocorrer ligação às células receptoras, as vesículas extracelulares podem permanecer associadas, desacoplar ou fundir a membrana plasmática ao qual está ligada (RAPOSO; STORVOGEL, 2013). O processo de internalização das EVs ocorre pela liberação do seu conteúdo dentro do fagolisossomo ou podem ser armazenadas no endossoma tardio (RAPOSO; STORVOGEL, 2013). Por outro lado, EVs também podem se conectar e ativar vias de sinalização nas células alvo por meio

de interação ligante-receptor. Estes receptores incluem receptores de membrana como TLR2, TLR4, CD56 e CD94, em células do sistema imunológico. Proteínas específicas como MHC classe I e II, receptores de tetraspaninas e transferrina são ativas nas vias de sinalização e junção das células-alvo. Além de mediar a troca de informações intercelulares através de moléculas de superfície, EVs demonstraram ser portadoras de importantes mediadores solúveis, como citocinas (VALADI *et al.*, 2007). Um exemplo do envolvimento de vesículas extracelulares no transporte de citocinas é a interleucina 1 β (IL-1 β), que é liberada pelas células após a fusão dos lisossomos secretores com a membrana plasmática e secretadas pelas EVs (MACKENZIE *et al.*, 2001).

Figura 3 - Formação e mecanismos de interação de Vesículas Extracelulares e Célula Alvo.



Fonte: ZEMPRUCH *et al.*, 2016. Formação e mecanismos de interação de Vesículas Extracelulares e Célula Alvo. As células doadoras produzem vesículas extracelulares (EVs) que são compostas por moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A formação de corpos multivesiculares (MVBs), que ocorre por meio da invaginação da membrana endossômica, gera exossomos de tamanho homogêneo com componentes de membrana. A formação de ectossomos (ou microvesículas) ocorre a partir do brotamento na membrana plasmática ou ao longo de porções especializadas da membrana, como os nanotubos de membrana. As interações dos EVs com as células receptoras ocorrem por meio da fusão da membrana, ligação mediada pelo receptor ou fusão da membrana.

Diversas funções e efeitos nas células recipientes têm sido atribuídas às EVs. Funções fisiológicas incluem atuação na coagulação, comunicação neuronal e durante a gestação (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). EVs também participam na patogênese e no agravamento de diversas doenças por suprimir a resposta imunológica (escape), promover metástase (em tumores) e estimular a angiogênese (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Efeitos importantes sobre o sistema imunológico tem sido observados, tais como apresentação de antígenos, ativação e diferenciação de células T, ativação e supressão de macrófagos e células NK, efeitos sobre células B, entre outros (ROBBINS; DORRONSORO; BOOKER, 2016; ROBBINS; MORELLI, 2014; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Compreender melhor o papel de EVs na imunidade pode levar a diversas aplicações clínicas, como desenvolvimento de tratamentos inovadores, elaboração de vacinas e descoberta de novos biomarcadores.

4.3 Vesículas Extracelulares e Sistema Imunológico

EVs liberadas por células do sistema imunológico podem modular respostas imunes inata e adquiridas de diferentes formas, tais como: por interação receptor-ligante; carreando mediadores pró-inflamatórios e citocinas; por apresentação direta de antígenos; por apresentação cruzada de antígenos; e por ativação por células apresentadoras de antígenos e fagocíticas (ROBBINS; MORELLI, 2014). Alguns desses mecanismos foram observados durante infecção e podem ser resumidos em alguns tópicos principais (Figura 4) (GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ; *et al.*, 2013):

- EVs liberadas por células dendríticas ativadas ou infectadas podem carrear complexos Ag-MHC-II e moléculas co-estimuladoras (THÉRY *et al.*, 2002). Essas EVs podem transferir a capacidade de apresentação de Ag para outras APCs e, também, podem ativar diretamente as células T (THÉRY *et al.*, 2002);

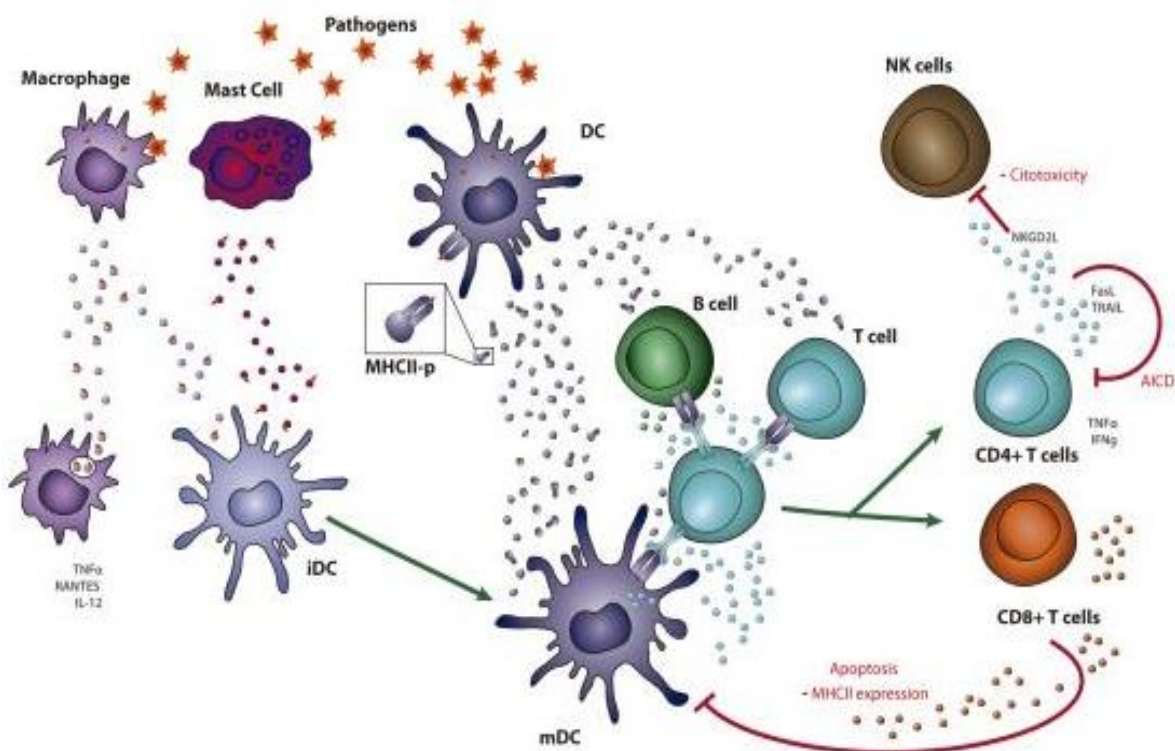
- Macrófagos podem transferir EVs contendo Ag para DCs e assim induzir a maturação e apresentação dos Ags por essas células (CHENG; WANG; HUANG, 2017). EVs liberadas por macrófagos infectados por patógenos podem também levar a ativação de outros macrófagos não infectados (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014);

- Células T podem liberar EVs durante a sinapse imunológica. Quando ativadas, essas células liberam EVs contendo TCR e CD40L, atuando na ativação de células B (DUSTIN, 2017);

- Células B também liberam EVs contendo diversos fatores que atuam em outras células do sistema imunológico (TOLEDO *et al.*, 2020);

- EVs com propriedades imunorreguladoras também já foram identificadas. Essas EVs inibem a citotoxicidade de células NK, diminuem a capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas, e promovem a apoptose de células T ativadas e de células dendríticas (DUSTIN, 2017).

Figura 4 - Papel das Vesículas Extracelulares derivadas de células imunológicas durante o processo de infecção



Fonte: GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2013. iDC – célula dendrítica imatura; mDC – célula dendrítica madura; DC – célula dendrítica; AICD – morte celular induzida por ativação

A seguir serão detalhados alguns dos mecanismos promovidos por EVs liberadas por células do sistema imunológico no contexto de infecções, especialmente as causadas por parasitas protozoários, como *Leishmania*.

4.4 Células Apresentadoras de Antígenos

As células apresentadoras de antígenos são compostas por células dendríticas, células B e macrófagos e são responsáveis por apresentar antígenos via MHC-I e MHC-II para células TCD8⁺ e TCD4⁺, respectivamente. EVs liberadas por essas células podem apresentar antígenos, ativar células NK e células T, suprimir o sistema imune e ter efeitos anti-inflamatórios, sendo assim participantes importantes nas respostas imunológicas (ROBBINS; MORELLI, 2014).

Além disso, EVs de qualquer tipo celular podem ser fonte de antígenos para células apresentadoras de antígenos, visto que diferentes tecidos podem armazenar antígenos sinalizando a presença de inflamação. Exossomos provenientes de células epiteliais e leucocitárias podem ser internalizadas por células dendríticas imaturas que então tornam-se maduras e apresentam esses antígenos a células TCD4⁺ (LEONE; REES; KAIN, 2018).

4.4.1 Células Dendríticas

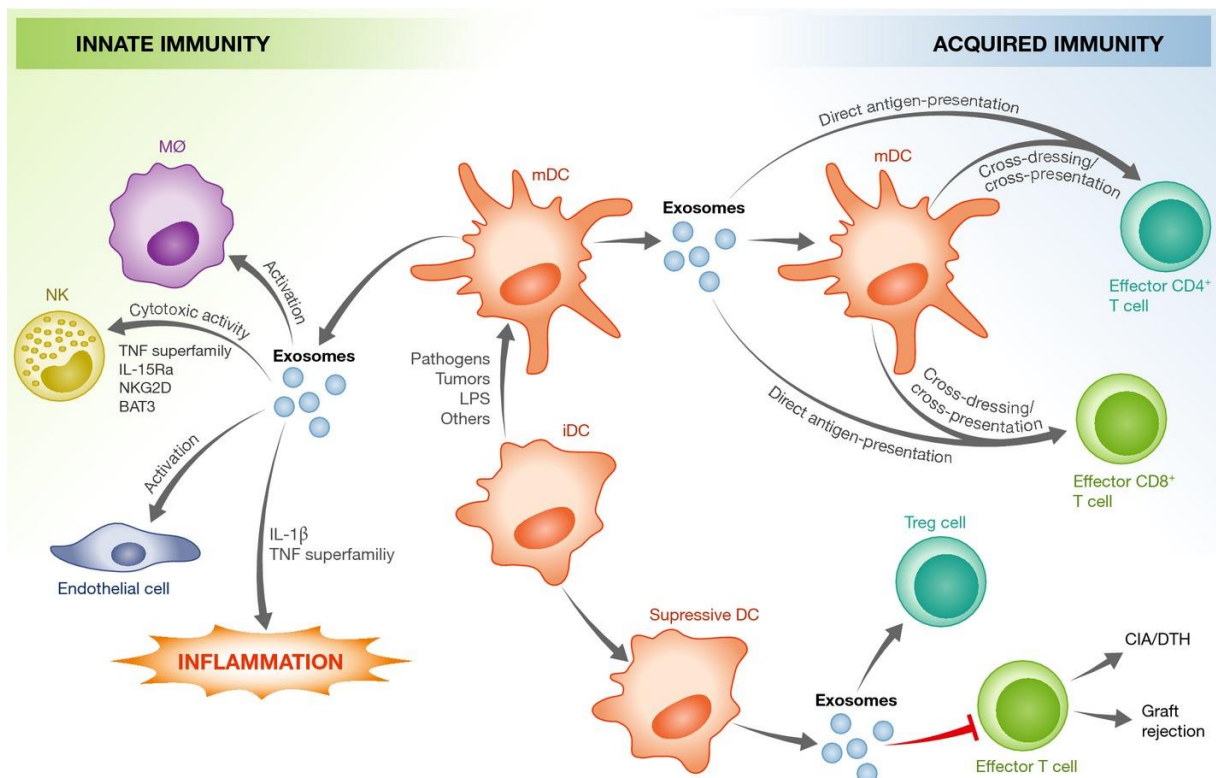
Células dendríticas possuem a capacidade de internalizar antígenos microbianos e transportá-los até os gânglios linfáticos, para apresentação de antígenos aos linfócitos T. Assim, essas células possuem funções relacionadas tanto a imunidade inata como adaptativa (PATENTE *et al.*, 2018). As células que migram dos tecidos para os gânglios linfáticos podem ser definidas como células dendríticas maduras ou células dendríticas imaturas, sendo a última diferenciada pela capacidade de capturar antígeno, porém incapaz de ativar células T. As células dendríticas imaturas podem atuar na apresentação de autoantígeno resultando na inativação ou morte de células T e na produção de células T reguladoras (PATENTE *et al.*, 2018). As células dendríticas maduras expressam grandes quantidades de moléculas do complexo MHC classe I e II, além de moléculas coestimuladoras de células T em sua superfície celular. Essas moléculas podem ser destinadas para EVs derivadas de células dendríticas (TKACH *et al.*, 2017).

Exossomos portadores de antígenos são capazes de estimular, *in vivo*, a ativação de células TCD4⁺ virgens específicas para antígenos (TKACH *et al.*, 2017) e estimulam fortemente o crescimento e a diferenciação *in vitro* e *in vivo* de células

TCD8⁺, restritas a MHC classe I (KOWAL *et al.*, 2016). Embora tenhamos conhecimento de que tanto exossomos quanto microvesículas podem ser liberadas por células semelhantes, os exossomos e as microvesículas derivadas diferem quanto ao conteúdo e a capacidade de estimular respostas imunológicas (KOWAL *et al.*, 2016; KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014; SCHIERER *et al.*, 2018).

A Figura 5 apresenta um resumo das funções das EVs liberadas pelas células dendríticas (SCHOREY *et al.*, 2015). Além da apresentação de antígenos, exossomos derivados de células dendríticas podem conter TNF- α , FasL e TRAIL os quais permitem, por exemplo, eliminar células tumorais por indução de apoptose (MUNICH *et al.*, 2012). EVs contendo TNF- α podem ter outros efeitos, incluindo a estimulação da secreção de interferon gama em células NK (REINERS *et al.*, 2014), contribuindo para a ativação de resposta imunológica protetora.

Figura 5 – Exossomos liberados por células do sistema imunológico.



Fonte: SCHOREY *et al.*, 2015. Exossomos liberados por células dendríticas maduras (mDCs) podem apresentar antígenos para células T, estimular respostas em diversas células imunológicas e não imunológicas e promover uma resposta pró-inflamatória. Fatores presentes nos exossomos mediam o tipo de resposta. Em contraste, exossomos de células dendríticas imaturas (iDCs) parecem ser imunossupressoras e induzem apoptose em células T efetoras ou promovem a ativação de células T reguladoras. CIA, artrite induzida por colágeno; DTH, hipersensibilidade do tipo tardio.

Em relação ao papel de EVs liberadas por células dendríticas no contexto de infecções, foi observada a presença de fatores de virulência de patógenos em exossomos derivados de células dendrítica infectadas por *Staphylococcus aureus* (HUSMAN *et al.*, 2009), *Bacillus anthracis* (ABRAMI *et al.*, 2013) e *Helicobacter pylori* (SHIMODA *et al.*, 2016). Acredita-se que via EVs, a infecção consegue se espalhar, levando esses fatores de virulência para órgãos e tecidos distantes. Por outro lado, exossomos liberados por células dendríticas infectadas por *Chlamydia* induziram a produção de IFN- γ por células NK, uma vez que essas partículas continham TNF- α ligado à membrana (RADOMSKI *et al.*, 2019). Efeito estimulador da resposta imunológica também foi observado por EVs derivadas de células dendríticas pulsadas *in vitro* com antígenos de *Toxoplasma gondii*. Essas EVs foram capazes de estimular respostas imunológicas *in vivo* e tiveram um efeito protetor em modelo de infecção experimental com *T. gondii* (ALINE *et al.*, 2004; BEAUVILLAIN; *et al.*, 2007). Assim, EVs liberadas por células dendríticas infectadas ou estimuladas com antígenos de agentes patogênicos podem ter diferentes papéis na indução da resposta imunológica. Estudos adicionais podem contribuir melhor para avaliar o papel dessas EVs na resposta imunológica.

4.4.2 Macrófagos

Os macrófagos são células mononucleares que reconhecem moléculas microbianas e endógenas e são capazes de produzir vesículas extracelulares, assim como diferentes células do sistema imunológico. Os macrófagos são ativados em resposta a um estímulo, produzindo diferentes citocinas que aumentam ou diminuem a inflamação. A resposta pró-inflamatória intensa de macrófagos pode gerar citotoxicidade e destruição do tecido, desencadeando fibrose tecidual (CHAPLIN, 2010).

Vesículas extracelulares derivadas de macrófagos estão relacionadas a regulação das respostas imunes inatas, bem como na diferenciação e ativação de macrófagos e outras células (GROOT KORMELINK *et al.*, 2018). Já foi demonstrado que microvesículas derivadas de macrófagos contêm altos níveis de miR-223, o qual

parece estar relacionado a diferenciação de monócitos, sugerindo papel na homeostase dessas células (ISMAIL *et al.*, 2013).

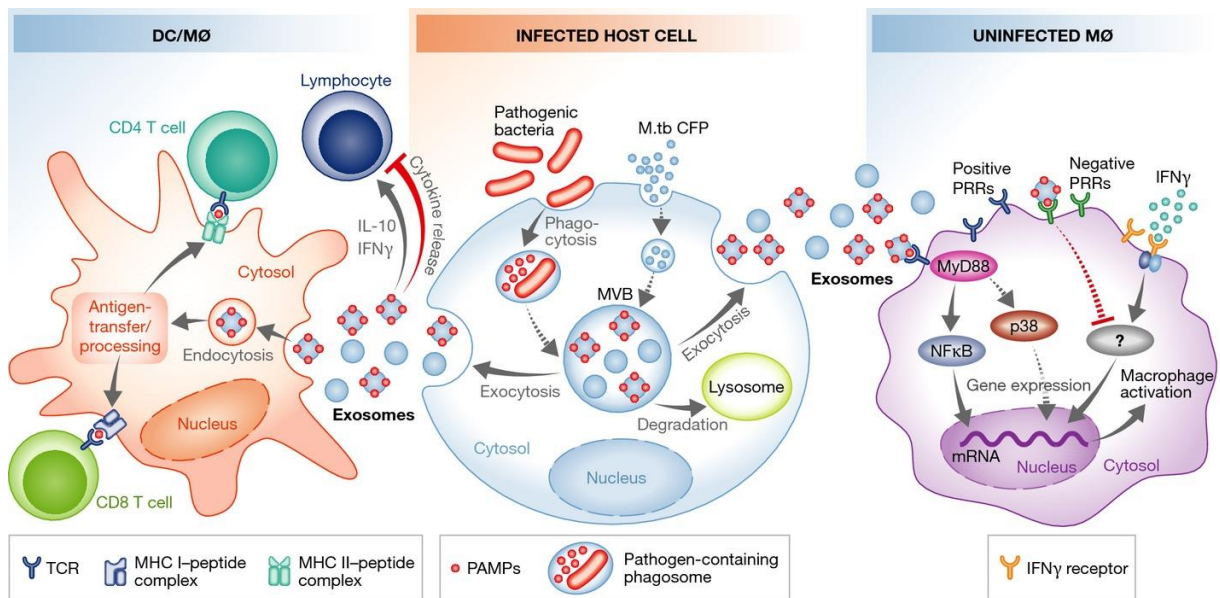
Durante o processo infeccioso, EVs secretadas por macrófagos infectados, ou que foram estimulados com antígenos bacterianos, induziram a ativação de células dendríticas e de células T tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SCHOREY *et al.*, 2015). Macrófagos infectados com *Mycobacterium avium* liberaram exossomos contendo glicopeptidolipídeos, um importante constituinte da parede celular do patógeno (BHATNAGAR; SCHOREY, 2007). Esses exossomos estimularam a resposta pró-inflamatória em macrófagos em repouso (BHATNAGAR; SCHOREY, 2007). Ainda, macrófagos infectados por bactérias liberaram EVs, capazes de estimular a produção de mediadores pró inflamatórios, incluindo TNF- α , por neutrófilos e macrófagos (O'NEILL; QUAH, 2008). Padrão similar foi observado em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*. EVs liberadas por esses macrófagos estimularam macrófagos não estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 β e TNF- α), podendo contribuir para diferenciação de resposta Th1, que é protetora para leishmaniose cutânea (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2014).

EVs liberadas por macrófagos infectados ou estimulados com componentes microbianos podem conter componentes dos patógenos, citocinas, receptores, MHC e moléculas coestimuladoras. Assim, essas EVs podem apresentar antígenos, ativar células B, T, NK e macrófagos naives. De fato, EVs liberadas por macrófagos infectados por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* continham antígenos micobacterianos e foram capazes de estimular a proliferação e ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ e a maturação de células dendríticas derivadas de medula óssea (GIRI; SCHOREY, 2008). Para *Leishmania*, estudos proteômicos mostraram a presença de GP63 (um fator de virulência de *Leishmania*) em EVs liberadas por macrófagos da linhagem J774 infectados com *Leishmania mexicana* (HASSANI; OLIVIER, 2013). Além disso, também foram detectadas proteínas do hospedeiro diferentemente expressas (por exemplo histonas, HSP-70, CD36 e MHC) em EVs de macrófagos humanos infectados com *Leishmania infantum*.

Em resumo, esses resultados sugerem que vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados podem promover ativação/regulação de células

imunológicas, desempenhando papel importante na estimulação de resposta imune inata e adaptativa (SCHOREY *et al.*, 2015) (Figura 6). A magnitude e o tipo de ativação parecem ser dependentes da natureza do patógeno, o qual vai influenciar a composição das EVs liberadas pelos macrófagos.

Figura 6 – Ação de exossomos liberados por macrófagos e células infectadas.



Fonte: SCHOREY *et al.*, 2015. Macrófagos infectados liberam exossomos contendo antígenos que induzem a ativação de células T CD4+ e CD8+ específicas ao antígeno e estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos naive. Em contraste, alguns exossomos liberados por células infectadas inibem a produção de citocinas pelas células T ou limitam a resposta dos macrófagos à estimulação por IFN- γ .

4.4.3 Linfócitos

As principais células do sistema imune adaptativo são os linfócitos, células que expressam receptores de antígenos distribuídos clonalmente e com especificidade distinta para diferentes antígenos. Essas células são divididas em diferentes classes, de acordo com sua função e seus produtos proteicos: linfócitos B, linfócitos NK, células NKT e linfócitos T, este último ainda subdividido em linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e células T reguladoras (CHAPLIN, 2010).

4.4.3.1 *Natural Killer (NK)*

As células NK são células linfóides inatas, que possuem diferentes receptores ativadores e inibitórios na sua superfície celular (CHAPLIN, 2010). Tem como função reconhecer e destruir as células infectadas e transformadas, representando um sistema de controle de patógenos, de crescimento tumoral e de difusão de metástases (BALD *et al.*, 2020). Já as células NKT são um subconjunto de linfócitos T caracterizados pela expressão de uma cadeia α de TCR invariante (TYZNIK *et al.*, 2014).

Assim como as outras células do sistema imunológico, células NK e NKT se comunicam com células dendríticas, macrófagos, células T e B, regulando assim respostas imunológicas inatas e adaptativas. A comunicação acontece por ligação com receptores de membrana (contato célula-célula), por citocinas e quimiocinas. Independentemente do nível de ativação, estudos mostraram que células NK são capazes de liberar exossomos contendo marcadores e proteínas importantes, como o CD56 e perforina (LUGINI *et al.*, 2012). Essas EVs podem ser captadas pelas células alvo levando a morte celular, além de ter atividade anti-tumoral *in vivo* e *in vitro* (LUGINI *et al.*, 2012).

Células NK também podem ser ativadas por EVs liberadas por outras células do sistema imunológico. A ligação direta dessas EVs a receptores de superfície pode ativar as células NK, aumentando sua atividade citotóxica, ou estimular a produção de IFN- γ , devido a presença de TNF- α na superfície das EVs (MUNICH *et al.*, 2012; SIMHADRI *et al.*, 2008).

Poucos estudos têm abordado a ativação e/ou liberação de EVs por células NK e NKT no contexto de infecções. Contudo, foi demonstrado que EVs liberadas por *L. infantum* inibiram a expansão de células T invariantes naturais killer (iNKT) do sangue periférico humano em resposta ao seu ligante específico, o glicolípido α -GalactosilCeramida (α -GalCer), bem como sua capacidade de produzir IL-4 e IFN- γ (BELO *et al.*, 2017). Assim, esse estudo propõe uma nova estratégia de escape das respostas imunológicas de *L. infantum* (BELO *et al.*, 2017). Estudos para entender melhor os mecanismos imunomoduladores de EVs sobre células NK e NKT podem contribuir para compreensão dos seus efeitos na imunidade a diferentes patógenos.

4.4.3.2 Linfócitos T e Linfócitos B

Os linfócitos são células capazes de reconhecer e responder de forma específica a antígenos estranhos, funcionando como pilares importantes da imunidade humoral e celular (CHAPLIN, 2010).

Vesículas extracelulares derivadas de células T apresentam um importante papel na ativação de respostas imunológicas. Células T liberam EVs após ativação do receptor TCR. Estudos mostraram que as células T liberam, *in vitro*, microvesículas compostas com TCR e CD40L em sua superfície celular e que sua produção é aumentada conforme ocorre a ativação do TCR (BLANCHARD *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2019). A presença dessas moléculas pode ter papel na ativação, proliferação e diferenciação de células B (LU *et al.*, 2019). Interessantemente, por citometria de fluxo de alta resolução populações de vesículas derivadas de células T CD4⁺ foram identificadas e quantificadas em resposta a diferentes estímulos de ativação (VAN DER VLIST *et al.*, 2012). Esses estudos são importantes para elucidar a função dessas EVs *in vivo*, e para projetar imunoterapias e vacinas baseadas em EVs (LU; *et al.*, 2019).

Células B produzem anticorpos, citocinas e também podem ter função como células apresentadoras de antígenos (CHAPLIN, 2010). Exossomos liberados *in vitro* por células B apresentam em sua superfície MHC classe II e são capazes de estimular respostas de células T restritas a esse complexo, específicas para antígeno (VAN DER VLIST *et al.*, 2012). A liberação de EVs derivadas de células B é estimulada pela interação com células T CD4⁺ via complexo MHC classe II. Os exossomos derivados de células B estimularam a liberação de IL-2 por células TCD4⁺, que reconheceram antígenos de forma específica (RAPOSO *et al.*, 1996).

Células B-1, uma subpopulação de células B, majoritariamente encontradas na cavidade peritoneal e pleural de camundongos. São fenotipicamente caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície como CD19⁺, IgM^{hi}, IgD^{low}, B220^{low}, CD43⁺, CD11b e CD5, sendo o último marcador necessário para a distinção entre as células B-1a (CD5⁺) e células B1-b (CD5⁻) (BAUMGARTH, 2011). As células B-1 são capazes de produzir citocina IL-10, importante regulador das respostas imunológicas (O'GARRA *et al.*, 1992). Estudo recente do nosso grupo mostrou que células B-1

peritoneais liberam espontaneamente EVs com a presença de moléculas MHC II (TOLEDO *et al.*, 2020). Após infecção *in vitro* com *Leishmania amazonensis*, essas células aumentaram a produção de EVs, mas com diminuição da presença de MHC II. A importância das EVs liberadas por células B-1 no contexto da infecção por *Leishmania* foi demonstrado. Essas EVs modularam a produção de citocinas por macrófagos e tiveram um efeito protetor em camundongos experimentalmente infectados com *L. amazonensis* (TOLEDO *et al.*, 2020). Estudos adicionais para compreender melhor como EVs liberadas por células B participam da ativação e/ou regulação das respostas imunes pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

4.5 Diagnóstico e Vesículas Extracelulares

EVs foram caracterizadas como biomarcadores e podem ser utilizadas no diagnóstico e monitoramento de diversas doenças por estarem presentes em diferentes fluidos corporais (THÉRY *et al.*, 2006). Foram propostos como biomarcadores em diferentes diagnósticos, como em doenças renais, neuronais, autoimunes e diversos cânceres (BEARD; MEANEY; ISSADORE, 2020; CHISTIYAKOV; OREKHOV; BOBRYSHV, 2016; PANG *et al.*, 2020; PAOLINI; ZENDRINI; RADEGHIERI, 2018). Além disso, sabemos que as EVs são capazes de carrear antígenos de patógenos e de células tumorais (GIRI; SCHOREY, 2008; HASSANI; OLIVIER, 2013; PANG *et al.*, 2020).

Em estudos de células de câncer pancreático, evidências mostraram que as EVs possuíam fragmentos de DNA genômico que engloba todos os cromossomos, representando que esses exossomos podem ser utilizados para indicativo deste tipo de câncer e auxiliar na escolha clínica do tratamento (PANG; ZHU; NI; THOMPSON *et al.*, 2020). Evidências mostraram que células tumorais de glioblastoma liberam exossomos que carregam variantes de RNA mensageiro e microRNAs característicos que podem ser detectados em pacientes que apresentam a doença, ajudando no diagnóstico e auxiliando na decisão da terapia (YEKULA *et al.*, 2019). Pacientes com câncer de mama expressam múltiplas moléculas na superfície de EVs presentes no

soro, podendo então ser também empregadas como marcador diagnóstico e prognóstico do câncer (GREEN *et al.*, 2015).

Para doenças negligenciadas como a leishmaniose, existem poucos estudos relacionados ao diagnóstico com EVs. Células fagocíticas como macrófagos, células B-1 e células dendríticas, internalizam *Leishmania* e são capazes de liberar exossomos, possivelmente contendo proteínas do patógeno (HASSANI; OLIVIER, 2013; SILVERMAN *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2020). Além disso, o próprio parasita pode liberar EVs as quais podem ser identificadas por diversas metodologias, como citometria de fluxo, análise do conteúdo proteico ou do material genético. Contudo, uma reflexão importante é a de avaliar o potencial de aplicação dessas técnicas na rotina de um laboratório clínico. Embora essas análises possam fornecer detalhes sobre as EVs recuperadas de biofluidos, a falta de experiência dos analistas, o custo dos instrumentos, o volume limitado das amostras e o tempo necessário para processar a avaliação completa de EVs são fatores que devem ser levados em consideração (SHAO *et al.*, 2018).

Uma abordagem usando EVs do parasita para rastrear anticorpos presentes no soro dos pacientes pode ser uma metodologia aplicável à rotina diagnóstica. Outra abordagem poderia ser o uso de análise de expressão gênica para amplificar moléculas específicas de DNA ou RNA dos patógenos presentes nas EVs. Essas e outras metodologias poderão ser desenvolvidas nos próximos anos, tornando o diagnóstico de doenças infecciosas mais preciso e acurado.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação celular baseada em vesículas extracelulares é elucidada por muitos estudos e apesar de haver grande quantidade de publicações sobre esse tema, pouco ainda é conhecido sobre o universo das vesículas extracelulares. Um notável desafio compartilhado por diferentes artigos refere-se ao termo utilizado para descrever a vesícula extracelular, possivelmente relacionado a dificuldade de separação da variedade de vesículas com diferentes tamanhos, visto que a análise individual dessas populações é necessária para estudos com vesículas extracelulares, podendo gerar grandes oportunidades de uso, como biomarcadores e diagnósticos de doenças.

Além disso, poucos estudos foram encontrados com abordagem específica em macrófagos, linfócitos B e T e mais especificamente linfócitos B-1, o que reflete a oportunidade de crescimento de estudos nessa área. Hoje sabemos que os linfócitos B-1 possuem grande importância na infecção por Leishmaniose e que estudos recentes mostraram que vesículas extracelulares participam efetivamente da resposta imunológica. Assim as vesículas extracelulares derivadas dessas células podem futuramente ser empregadas para diagnóstico e prognóstico da doença.

Foi comprovado por diversos experimentos que células de mamíferos, inclusive as do sistema imunológico são capazes de liberar vesículas extracelulares, tanto *in vitro*, como *in vivo*. Essas EVs também estão presentes em diferentes fluidos biológicos. Além disso, essas vesículas são capazes de transportar proteínas, RNA das células de origem, sendo um ponto importante para uso das vesículas como diagnóstico de doenças.

Assim, nesta revisão concentramos uma abordagem sobre vesículas extracelulares e as possibilidades de uso das vesículas extracelulares como marcadores biológicos no diagnóstico de diversas doenças. E, embora hoje os estudos sobre vesículas extracelulares sejam poucos, essa área pode se destacar e ser bastante promissora.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World**, 11, n. 5, p. 627-635, May 2018.
- ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cell Mol Neurobiol**, 36, n. 3, p. 301-312, Apr 2016.
- ABRAMI, L. *et al.* Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. **Cell Rep**, 5, n. 4, p. 986-996, Nov 2013.
- ALINE, F. *et al.* Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection. **Infect Immun**, 72, n. 7, p. 4127-4137, Jul 2004.
- BALD, T. *et al.* The NK cell-cancer cycle: advances and new challenges in NK cell-based immunotherapies. **Nat Immunol**, 21, n. 8, p. 835-847, Aug 2020.
- BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 1, p. 34-46, Jan 2011.
- BEARD, K.; MEANEY, D. F.; ISSADORE, D. Clinical Applications of Extracellular Vesicles in the Diagnosis and Treatment of Traumatic Brain Injury. **J Neurotrauma**, Jun 2020.
- BEAUVILLAIN, C. *et al.* A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against T. gondii infection in syngeneic and allogeneic mice. **Microbes Infect**, 9, n. 14-15, p. 1614-1622, 2007 Nov-Dec 2007.
- BELO, R. *et al.* Exoproducts Inhibit Human Invariant NKT Cell Expansion and Activation. **Front Immunol**, 8, p. 710, 2017.
- BHATNAGAR, S.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. **J Biol Chem**, 282, n. 35, p. 25779-25789, Aug 2007.
- BLANCHARD, N. *et al.* TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. **J Immunol**, 168, n. 7, p. 3235-3241, Apr 2002.
- BRETSCHER, P. On Analyzing How the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response Is Determined: Classical Observations Must Not Be Ignored. **Front Immunol**, 10, p. 1234, 2019.
- BYSTROM, J. *et al.* Functional and phenotypic heterogeneity of Th17 cells in health and disease. **Eur J Clin Invest**, 49, n. 1, p. e13032, Jan 2019.
- CAI, H.; REINISCH, K.; FERRO-NOVICK, S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. **Dev Cell**, 12, n. 5, p. 671-682, May 2007.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, 125, n. 2 Suppl 2, p. S3-23, Feb 2010.

CHENG, L.; WANG, Y.; HUANG, L. Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. **Mol Ther**, 25, n. 7, p. 1665-1675, 07 2017.

CHISTIAKOV, D. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y. V. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. **Int J Mol Sci**, 17, n. 1, Jan 2016.

COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends Parasitol**, 31, n. 10, p. 477-489, Oct 2015.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Extracellular vesicles from Leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 9, p. e3161, Sep 2014.

CYSTER, J. G.; ALLEN, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. **Cell**, 177, n. 3, p. 524-540, 04 2019.

DAHA, M. R. Grand challenges in molecular innate immunity. **Front Immunol**, 2, p. 16, 2011.

DUSTIN, M. L. Help to go: T cells transfer CD40L to antigen-presenting B cells. **Eur J Immunol**, 47, n. 1, p. 31-34, 01 2017.

FREITAS, M. S. *et al.* Fungal Extracellular Vesicles as Potential Targets for Immune Interventions. **mSphere**, 4, n. 6, 11 2019.

GASTEIGER, G. *et al.* Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. **J Innate Immun**, 9, n. 2, p. 111-125, 2017.

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

GOLUBOVSKAYA, V.; WU, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. **Cancers (Basel)**, 8, n. 3, Mar 2016.

GREEN, T. M. *et al.* Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Contribution to the Metastatic Phenotype. **Biomed Res Int**, 2015, p. 634865, 2015.

GROOT KORMELINK, T. *et al.* The role of extracellular vesicles when innate meets adaptive. **Semin Immunopathol**, 40, n. 5, p. 439-452, 09 2018.

GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C. *et al.* Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. **Immunol Rev**, 251, n. 1, p. 125-142, Jan 2013.

HASSANI, K.; OLIVIER, M. Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 5, p. e2185, 2013.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B Cells, Antibodies, and More. **Clin J Am Soc Nephrol**, 11, n. 1, p. 137-154, Jan 2016.

HUPPA, J. B.; DAVIS, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. **Nat Rev Immunol**, 3, n. 12, p. 973-983, 12 2003.

HUPPA, J. B.; DAVIS, M. M. The interdisciplinary science of T-cell recognition. **Adv Immunol**, 119, p. 1-50, 2013.

HUSMANN, M. *et al.* Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. **FEBS Lett**, 583, n. 2, p. 337-344, Jan 2009.

ISMAIL, N. *et al.* Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. **Blood**, 121, n. 6, p. 984-995, Feb 2013.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int J Mol Sci**, 20, n. 23, Nov 2019.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, 11, n. 5, p. 373-384, May 2010.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, 5, p. 461, 2014.

KOWAL, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113, n. 8, p. E968-977, Feb 2016.

KOWAL, J.; TKACH, M.; THÉRY, C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Curr Opin Cell Biol**, 29, p. 116-125, Aug 2014.

LATIFKAR, A. *et al.* New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. **J Cell Sci**, 132, n. 13, 07 2019.

LEICK, M. *et al.* Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. **Cell Tissue Res**, 355, n. 3, p. 647-656, Mar 2014.

LEONE, D. A.; REES, A. J.; KAIN, R. Dendritic cells and routing cargo into exosomes. **Immunol Cell Biol**, May 2018.

- LI, J. *et al.* The Coordination Between B Cell Receptor Signaling and the Actin Cytoskeleton During B Cell Activation. **Front Immunol**, 9, p. 3096, 2018.
- LIM, J. J.; GRINSTEIN, S.; ROTH, Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, p. 191, 2017.
- LIU, C. H.; LIU, H.; GE, B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. **Cell Mol Immunol**, 14, n. 12, p. 963-975, Dec 2017.
- LIU, Y. *et al.* Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. **Front Microbiol**, 9, p. 1502, 2018.
- LU, J.; WU, J.; XIE, F.; TIAN, J. *et al.* CD4. **Adv Sci (Weinh)**, 6, n. 23, p. 1802219, Dec 2019.
- LUGINI, L. *et al.* Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. **J Immunol**, 189, n. 6, p. 2833-2842, Sep 2012.
- MACIA, L. *et al.* Host- and Microbiota-Derived Extracellular Vesicles, Immune Function, and Disease Development. **Int J Mol Sci**, 21, n. 1, Dec 2019.
- MACKENZIE, A. *et al.* Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity**, 15, n. 5, p. 825-835, Nov 2001.
- MARSHALL, J. S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy Asthma Clin Immunol**, 14, n. Suppl 2, p. 49, 2018.
- MCNAB, F. *et al.* Type I interferons in infectious disease. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 2, p. 87-103, Feb 2015.
- MITTELBRUNN, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nat Commun**, 2, p. 282, 2011.
- MODLIN, R. L. Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten. **J Invest Dermatol**, 132, n. 3 Pt 2, p. 882-886, Mar 2012.
- MUNICH, S. *et al.* Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. **Oncoimmunology**, 1, n. 7, p. 1074-1083, Oct 2012.
- NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays Biochem**, 60, n. 3, p. 275-301, 10 2016.
- NOVAES E BRITO, R. R. *et al.* B-1 cell response in immunity against parasites. **Parasitol Res**, 118, n. 5, p. 1343-1352, May 2019.
- O'GARRA, A. *et al.* Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol**, 22, n. 3, p. 711-717, Mar 1992.

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

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, 50, n. 4, p. 871-891, 04 2019.

PANG, B. *et al.* Extracellular vesicles: the next generation of biomarkers for liquid biopsy-based prostate cancer diagnosis. **Theranostics**, 10, n. 5, p. 2309-2326, 2020.

PAOLINI, L.; ZENDRINI, A.; RADEGHERI, A. Biophysical properties of extracellular vesicles in diagnostics. **Biomark Med**, 12, n. 4, p. 383-391, 04 2018.

PATENTE, T. A. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, 9, p. 3176, 2018.

PENNOCK, N. D. *et al.* T cell responses: naive to memory and everything in between. **Adv Physiol Educ**, 37, n. 4, p. 273-283, Dec 2013.

RADOMSKI, N. *et al.* -Infected Dendritic Cells Communicate with NK Cells via Exosomes To Activate Antibacterial Immunity. **Infect Immun**, 88, n. 1, 12 2019.

RAPHAEL, I. *et al.* T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, 74, n. 1, p. 5-17, Jul 2015.

RAPOSO, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med**, 183, n. 3, p. 1161-1172, Mar 1996.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, 200, n. 4, p. 373-383, Feb 2013.

REHWINKEL, J.; GACK, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 9, p. 537-551, Sep 2020.

REINERS, K. S. *et al.* Role of Exosomes Released by Dendritic Cells and/or by Tumor Targets: Regulation of NK Cell Plasticity. **Front Immunol**, 5, p. 91, 2014.

ROBBINS, P. D.; DORRONSORO, A.; BOOKER, C. N. Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. **J Clin Invest**, 126, n. 4, p. 1173-1180, Apr 2016.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.

ROCHE, P. A.; CRESSWELL, P. Antigen Processing and Presentation Mechanisms in Myeloid Cells. **Microbiol Spectr**, 4, n. 3, 06 2016.

SAUNDERSON, S. C. *et al.* Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. **J Immunol**, 180, n. 12, p. 8146-8152, Jun 2008.

SAXENA, M.; YERETSSIAN, G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. **Front Immunol**, 5, p. 327, 2014.

SCHIERER, S. *et al.* Extracellular vesicles from mature dendritic cells (DC) differentiate monocytes into immature DC. **Life Sci Alliance**, 1, n. 6, p. e201800093, Dec 2018.

SCHOREY, J. S. *et al.* Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. **EMBO Rep**, 16, n. 1, p. 24-43, Jan 2015.

SHAO, H.; IM, H. *et al.* New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. **Chem Rev**, 118, n. 4, p. 1917-1950, 02 2018.

SHEVYREV, D.; TERESHCHENKO, V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. **Front Immunol**, 10, p. 3100, 2019.

SHIMODA, A. *et al.* Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the Helicobacter pylori virulence factor CagA. **Sci Rep**, 6, p. 18346, Jan 2016.

SILVERMAN, J. M. *et al.* Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **J Immunol**, 185, n. 9, p. 5011-5022, Nov 2010.

SIMHADRI, V. R. *et al.* Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. **PLoS One**, 3, n. 10, p. e3377, 2008.

SPOLSKI, R.; LI, P.; LEONARD, W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. **Nat Rev Immunol**, 18, n. 10, p. 648-659, 10 2018.

SZEMPRUCH, A. J. *et al.* Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. **Nat Rev Microbiol**, 14, n. 11, p. 669-675, 11 2016.

THÉRY, C. *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr Protoc Cell Biol**, Chapter 3, p. Unit 3.22, Apr 2006.

THÉRY, C. *et al.* Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. **Nat Immunol**, 3, n. 12, p. 1156-1162, Dec 2002.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 8, p. 581-593, Aug 2009.

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

TKACH, M.; KOWAL, J.; THÉRY, C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 373, n. 1737, Jan 2018.

TKACH, M. *et al.* Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. **EMBO J**, 36, n. 20, p. 3012-3028, 10 2017.

TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. **Cell**, 164, n. 6, p. 1226-1232, Mar 2016.

TOLEDO, M. D. S. *et al.* Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. **J Leukoc Biol**, Apr 2020.

TSAI, D. Y. *et al.* Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. **J Biomed Sci**, 26, n. 1, p. 64, Sep 2019.

TYZNIK, A. J. *et al.* Distinct requirements for activation of NKT and NK cells during viral infection. **J Immunol**, 192, n. 8, p. 3676-3685, Apr 2014.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. **Front Immunol**, 8, p. 1368, 2017.

UZHACHENKO, R. V.; SHANKER, A. CD8. **Front Immunol**, 10, p. 1906, 2019.

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

VAN DER VLIST, E. J. *et al.* CD4(+) T cell activation promotes the differential release of distinct populations of nanosized vesicles. **J Extracell Vesicles**, 1, 2012.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 4, p. 213-228, Apr 2018.

VEERMAN, R. E. *et al.* Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles - Functions and Therapeutic Applications. **Trends Mol Med**, 25, n. 5, p. 382-394, 05 2019.

WEN, C. *et al.* Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, 6, n. 1, p. 1400370, 2017.

XIE, J.; TATO, C. M.; DAVIS, M. M. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. **Immunol Rev**, 251, n. 1, p. 65-79, Jan 2013.

XIE, Y. *et al.* Natural CD8⁺25⁺ regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma. **Biochem Biophys Res Commun**, 438, n. 1, p. 152-155, Aug 2013.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clin J Am Soc Nephrol**, 10, n. 7, p. 1274-1281, Jul 2015.

YEKULA, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment. **Front Immunol**, 10, p. 3137, 2019.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles**, 4, p. 27066, 2015.

ZHANG, X.; HUBAL, M. J.; KRAUS, V. B. Immune cell extracellular vesicles and their mitochondrial content decline with ageing. **Immun Ageing**, 17, p. 1, 2020.

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