



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

Caracterização e potencial imunomodulatório de vesículas  
extracelulares de células dendríticas tratadas com  
catelicidina LL-37

CANDIDATA: ADRIANA HANAI CIESLINSKI TAVARES

ORIENTADOR: DR. RINALDO WELLERSON PEREIRA

CO-ORIENTADOR: DR. FELIPE SALDANHA DE ARAUJO

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
MOLECULAR, DA FACULDADE DE  
MEDICINA, DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA COMO REQUISITO PARCIAL À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM  
PATOLOGIA MOLECULAR.

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

HC569c Hanai Cieslinski Tavares, Adriana  
Caracterização e potencial imunomodulatório de vesículas  
extracelulares de células dendríticas tratadas com  
catelicidina LL-37 / Adriana Hanai Cieslinski Tavares;  
orientador Rinaldo Wellerson Pereira; co-orientador Felipe  
Saldanha de Araújo. -- Brasília, 2019.  
104 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Vesículas extracelulares. 2. Células dendríticas. 3.  
Catelicidina LL-37. 4. Atividade imunomodulatória. I.  
Wellerson Pereira, Rinaldo, orient. II. Saldanha de Araújo,  
Felipe, co-orient. III. Título.

# **BANCA EXAMINADORA**

## **TITULARES**

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira,

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília

Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira,

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Profa. Dra. Juliana Lott de Carvalho,

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade,

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília

## **SUPLENTE**

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

*Dedico esta tese aos meus pais, Rosa e Armando  
(in memoriam); ao meu melhor amigo, Aldo Henrique e  
aos nossos filhos Nicole, Melissa e Henrique.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Rinaldo Wellerson, pela amizade, compreensão e acreditar que seria possível chegar nesse momento. Registro o meu respeito e admiração por seu trabalho e sua trajetória profissional, sobretudo o seu entusiasmo pela ciência.

Aos professores e colegas Felipe, Kelly, Wagner, André e Octávio pelas sugestões e auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

À professora Anamélia pela acolhida em seu laboratório e acima de tudo pela valiosa amizade.

À Dianny, Getúlio, Jordan, Breno, Nathália, Iara, Leidy, Lara, Brenda, Pedro, Rafael, Maurício, Ricardo, Osmel e a tantos outros que já não mais desfrutamos de suas agradáveis companhias no laboratório, mas que deixaram lembranças de muitos bons momentos e de grandes ensinamentos. Em especial à Martha e Beatriz que ajudaram muito no momento final e crucial desse trabalho.

Aos professores e colegas da Universidade Católica de Brasília pelo apoio, incentivo e palavra amiga e acreditar que era possível, Aline, Cristine, Vicente, Gislane, Simone, Caroline, Rafael, Samara, Taia, Simoni, Fernando, Fabiana, Cláudia, Juliana, Douglas, Flávia e tantos outros que viabilizaram a realização desse trabalho.

À minha família pela compreensão dos meus momentos de ausência e dedicação ao trabalho, cansaço e amor incondicional.

E ao meu marido, amigo e companheiro de vida, você mais do que ninguém sabe que esse trabalho não seria possível sem o seu apoio e amor incondicional...não tenho palavras para expressar a minha gratidão por você acreditar em mim.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>15</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>1. AS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VE).....</b>	<b>16</b>
1.1 Histórico.....	16
1.2 Nomenclatura e classificação.....	17
1.3 Biogênese.....	20
1.3.1 Via clássica.....	21
1.3.2 Via direta.....	22
1.4 Composição das vesículas extracelulares.....	23
1.4.1 Marcadores proteicos.....	24
1.4.2 RNA.....	26
1.4.3 Lipídeos.....	27
1.4.4 Pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs).....	28
1.5 Captura e tráfego de vesículas extracelulares .....	28
1.6 Vesículas extracelulares e sua ação sobre o sistema imunológico .....	29
<b>2. O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37.....</b>	<b>33</b>
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
1. Delineamento experimental.....	41
2. Obtenção e preparo do peptídeo LL-37.....	41
3. Obtenção de células dendríticas a partir de medula óssea de murinos.....	42
4. Tratamento de BMDCs com LL-37 para avaliação funcional (produção de citocinas) e purificação de VEs.....	43
5. Purificação de vesículas extracelulares e caracterização física.....	44
5.1 <i>Tunable Resistive Pulse Sensing</i> (tRPS).....	45
5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	45
6. Tratamento de BMDCs com VEs derivadas de BMDCs tratadas com LL-37.....	46
7. Avaliação das VEs derivadas de BMDCs (VE-LL-37 e VE-LPS) com linfócitos T alogênicos e singênicos e na reação mista de leucócitos.....	46

7.1 Avaliação da interação direta das vesículas extracelulares com linfócitos T alogênicos ou singênicos.....	47
7.2 Avaliação funcional das VEs na reação mista de leucócitos utilizando o modelo de infecção <i>in vitro</i> de BMDCs por leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	47
7.2.1 Cultivo do fungo <i>P. brasiliensis</i> e preparação do inóculo para infecção <i>in vitro</i> BMDCs.....	47
7.2.2 Reação mista de linfócitos.....	47
8. Avaliação funcional das VEs derivadas de BMDCs (VE-LL-37) na capacidade fungicida, produção de citocinas e óxido nítrico de macrófagos infectados por <i>P. brasiliensis</i> .....	48
8.1 Infecção de BMDMs com <i>P. brasiliensis</i> , tratamento com VE-LL-37 e determinação da carga fúngica.....	48
8.2 Dosagem de óxido nítrico na co-cultura com macrófagos.....	48
9. Análise estatística.....	49
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
1. Análise do grau de pureza e quantificação do peptídeo LL-37 .....	50
2. BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo produz citocina pró-inflamatórias.....	50
3. Análise da distribuição da população de VEs por tecnologia de resistência de pulso tRPS.....	54
4. Análise morfológica das VEs por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	57
5. Tratamento de BMDCs com VEs derivadas de LL-37-BMDCs tratadas com LL-37 (VE-LL-37) ou BMDCs tratadas com LPS (VE-LPS) .....	58
6. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativam linfócitos T alogênicos.....	60
7. VE-LL-37 modulam o perfil de secreção de citocinas de linfócitos T induzida por BMDCs infectadas por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	62
8. Macrófagos infectados com o fungo <i>P. brasiliensis</i> não tem sua atividade fungicida modificada pelo tratamento com VE-LL-37.....	64
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>



## LISTA DE ABREVIACOES

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BMDC	<i>Bone Marrow Dendritic Cell</i>
BMDM	<i>Bone Marrow Dendritic Macrophage</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DC	Célula Dendrítica
DMSO	dimetilsulfóxido
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
iDC	Célula Dendrítica imatura
mDC	Célula Dendrítica madura
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
ILV	Vesícula Intraluminal
ISEV	Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares
LL-37	Peptídeo antimicrobiano da família das catelicidinas
LPS	Lipopolissacarídeo
M1 e M2	Macrófago M1 e M2
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHC I	Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II
MV	Microvescula
MVB	Corpo Multivesicular
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PDL2	Fosfolipase D2
Rab GTPase	Proteína de reconhecimento e endereçamento, da família GTPase
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
TCR	Receptor de linfócito T
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa

tRPS	Tecnologia de Resistência por Pulso
TSG101	Proteína do gene 101 de susceptibilidade a tumor
VE	Vesícula Extracelular

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletromicrografia de plaquetas ativadas liberando microvesículas por brotamento de membrana plasmática .....	16
Figura 2. Eletromicrografia de transmissão de vesículas derivadas de células humanas isoladas por centrifugação diferencial a partir de amostras de plasma, urina .....	17
Figura 3. Sumário da nomenclatura de VEs .....	18
Figura 4. Representação esquemática das vias de biogênese de vesículas extracelulares .....	20
Figura 5. Composição molecular de uma típica vesícula extracelular inclui material genético, proteínas e lipídeos .....	23
Figura 6. Proposta de delineamento experimental para análise funcional de vesículas extracelulares .....	40
Figura 7. Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao peptídeo LL-37, com dupla carga, com pureza > 90% .....	49
Figura 8. Tratamento com LL-37 induz produção de citocinas e CCL2 em BMDCs diferenciadas na presença desse peptídeo com ou sem estímulo por LPS .....	50
Figura 9. BMDCs tratadas com LPS produzem citocinas e CCL2 .....	51
Figura 10. Tratamento concomitante de BMDCs com LPS e LL-37 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias .....	52
Figura 11. Distribuição por tamanho de VEs produzidas por células dendríticas murinas, em (A) tem-se VE-LPS e em (B) VE-LL-37, com o peptídeo em diferentes concentrações .....	53
Figura 12. Morfologia das vesículas extracelulares presentes nas amostras de sobrenadante de cultura celular de células dendríticas analisadas na microscopia eletrônica de transmissão .....	56
Figura 13. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias e CCL2 em fagócitos.....	57
Figura 14. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativam linfócitos T alogênicos .....	59
Figura 15. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) modulam a resposta de linfócitos T para o tipo 1 no modelo de infecção <i>in vitro</i> por <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	61
Figura 16. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) não alteram a capacidade fungicida, produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ por BMDMs infectados com <i>P. brasiliensis</i> .....	63

## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1. Marcadores específicos de células utilizados na análise de VEs de fluidos biológicos para identificar a sua origem celular .....	25
--	----

## RESUMO

As vesículas extracelulares (VEs) derivadas de células dendríticas (DCs) têm atraído atenção pela sua atividade na indução de repostas imunológicas específicas. Essas nanomoléculas secretadas por diferentes tipos celulares, em particular aquelas derivadas de DCs, são delimitadas por bicamada lipídica e estão relacionadas com a apresentação antigênica aos linfócitos T por meio da expressão de MHC e moléculas coestimulatórias em sua superfície vesicular. Durante o seu desenvolvimento, as DCs imaturas sofrem estímulos que influenciam no seu estado de maturação, tais como citocinas e peptídeos antimicrobianos. A catelicidina LL-37 é um peptídeo antimicrobiano predominante em ambientes inflamatórios e com capacidade imunomodulatória, incluindo a de promover a plasticidade do estado de diferenciação de DCs. Entretanto, não há relato na literatura se o estímulo da LL-37 sob as DCs reflete no perfil de VEs secretadas por essas células. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi caracterizar funcionalmente VEs derivadas de DCs induzidas por LL-37. Inicialmente, as DCs foram obtidas a partir da medula óssea de camundongos (BMDCs), expostas com LL-37, durante e após a sua diferenciação, para a verificação da sua atividade funcional por meio da dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-10, IL-1 $\beta$  e a quimiocina CCL2, por teste imunoenzimático ELISA. As VEs (VE-LL-37) foram então, obtidas do sobrenadante das culturas celulares das BMDCs e purificadas por ultracentrifugação diferencial e, em seguida caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição, por técnica de resistência de pulso (tRPS) e quanto a morfologia, por microscopia eletrônica (MET). Inicialmente, as VE-LL-37 induziram a produção de citocinas, incluindo a IL-12, tanto em DCs como em macrófagos. Além disso, a interação dessas VEs com linfócitos T alogênicos levou a ativação MHC-dependente dessas células com produção de IFN- $\gamma$ , sugestivo de fenótipo T1. Na reação mista de leucócitos utilizando o modelo de infecção *in vitro* de BMDCs por *Paracoccidioides brasiliensis*, o tratamento desses fagócitos com VE-LL-37 levou a reversão de um perfil T2, induzido pelo fungo, para T1. Finalmente, utilizando macrófagos infectados pelo *P. brasiliensis* verificamos, ao avaliar a viabilidade fúngica, a produção de NO $^-$  e TNF- $\alpha$ , que as VEs não têm a capacidade de modular as células infectadas. Os achados preliminares nesse estudo contribuem para a compreensão dos efeitos imunomodulatórios, na produção de citocinas e indução da resposta predominante T1, pelos quais as VEs derivadas de DCs estimuladas por LL-37 influenciam as respostas imune inata e adaptativa, abrindo novas possibilidades do uso de VEs no controle das respostas imunológicas, seja como terapia ou adjuvante em tratamentos imunomoduladores.

**Palavras-chave:** vesículas extracelulares, células dendríticas, LL-3, ação imunomodulatória

## ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) derived from dendritic cells (DCs) have attracted attention for their ability to induce specific immune responses. These nanomolecules released by different cell types, specially DCs, are lipid bilayer-delimited and are related to antigenic presentation to T lymphocytes by MHC and costimulatory molecules expression on their surface. During their development, immature DCs sense environment cues that influence their maturation state, such as cytokines and antimicrobial peptides. Cathelicidin LL-37 is an antimicrobial peptide predominantly found in inflammatory environments and with immunomodulatory capacity, including the promotion of DCs differentiation state plasticity. However, there is no report in the literature describing EVs derived from LL-37-treated DCs. In this sense, the aim of the present study was to functionally characterize DCs-derived EVs induced by LL-37. Initially, DCs were obtained from mouse bone marrow (BMDCs), exposed with LL-37, during and after its differentiation, that induced the production of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL -6, IL-12p70, and chemokine CCL2, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The EVs (EV-LL-37) were obtained from the supernatant of these cells and purified by differential ultracentrifugation and then characterized by size and distribution by pulse resistance technique (tRPS) and morphology by Transmission Electron Microscopy (MET). EV-LL-37 was capable of inducing cytokines secretion, including IL-12, in both DCs and macrophages. In addition, the interaction of these EVs with allogeneic T lymphocytes led to the MHC-dependent activation of these cells with IFN- $\gamma$  production, suggestive of T1 phenotype. In the mixed leukocyte reaction using the model of *in vitro* infection of BMDCs by *Paracoccidioides brasiliensis*, the treatment of these phagocytes with EV-LL-37 led to the reversion of a predominant T2 to T1 profile. Finally, employing macrophages infected with *P. brasiliensis*, we verified that EV-LL-37 did not modulate the fungicidal activity of these macrophages. Accordingly, NO $^-$  and TNF- $\alpha$  production, by these phagocytes were not affected by the presence of EV-LL-37. Preliminary findings in this study contribute to the understanding of immunomodulatory effects on cytokine production and induction of the predominant T1 response, in which EVs derived from DCs stimulated by LL-37 influence innate and adaptive immune responses, opening new possibilities for the use of EVs in the control of immunological responses, either as therapy or adjuvant in immunomodulatory treatments.

**Key words:** Extracellular vesicles, dendritic cells, LL-37, immunomodulatory activity

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

A descoberta das vesículas extracelulares como nova estratégia de comunicação celular e o seu potencial na modulação da resposta imunológica tem impulsionado as pesquisas sobre o assunto. Estudos apontam o papel dessas vesículas em processos fisiológicos e patofisiológicos. Possivelmente, as células secretoras dessas nanovesículas sofrem influência de fatores solúveis secretados durante um curso infeccioso, alterando quantitativamente e qualitativamente a sua produção. Da mesma forma que os fatores e mecanismos que afetam a plasticidade das células dendríticas e sua ação no sistema imune, a compreensão do papel de vesículas extracelulares derivadas dessas células ainda não está totalmente esclarecido.

As vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas tem sido amplamente estudada, haja visto o seu papel central na indução da resposta imune adaptativa, contudo, a literatura é escassa no que se refere a produção das vesículas após serem submetidas a tratamentos com peptídeos antimicrobianos.

É importante destacar que o campo de estudos de vesículas extracelulares é relativamente recente e bastante dinâmico no que tange aos protocolos e métodos utilizados para a sua obtenção, isolamento e purificação. De modo que a metodologia empregada na execução desse trabalho sofreu adequações e modificações, embora tenha sido mantida a consistência científica sempre que possível.

## **1. AS VESÍCULAS EXTRACELULARES**

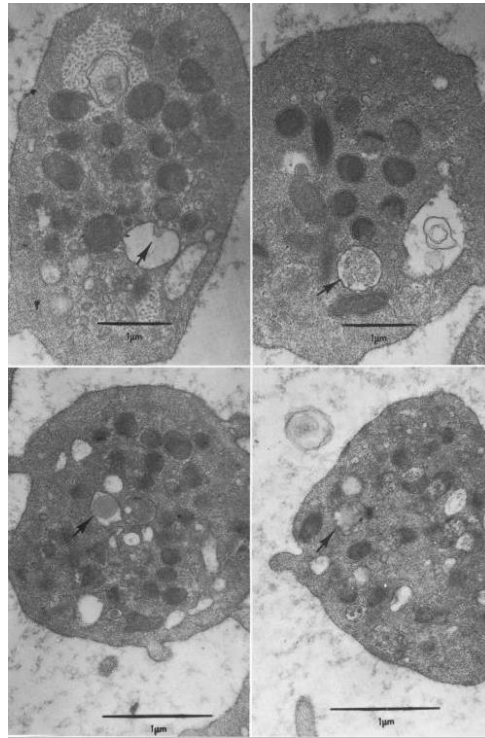
A comunicação e troca de informações entre as células pode ocorrer por meio de secreção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e pequenos mediadores celulares (p.ex. nucleotídeos e íons de óxido nítrico); pela adesão célula-célula, mediada por moléculas de adesão e; pelo uso de nanotúbulos (RATAJCZAK *et al.*, 2006). O papel das vesículas extracelulares (VEs), partículas esféricas e de tamanho variando entre 30 nm a 1 µm, derivadas de células e envolvidas na comunicação celular, surge como um outro mecanismo na década de 80 (HARDING *et al.*, 1983; PAN & JOHNSTONE, 1983).

### **1.1. Histórico**

Em meados da década de 40, estudos preliminares realizados por CHARGAFF e WEST apontam a descoberta de vesículas derivadas de células ao observarem que o tempo de coagulação do plasma aumentava significativamente em função do tempo e velocidade de centrifugação do sobrenadante. Ademais, ao adicionarem o precipitado (*pellet*) do plasma depletado do fator de coagulação notava-se a redução do tempo da cascata de coagulação, indicando a presença de um fator subcelular envolvido nesse processo. Após 20 anos, esse fator subcelular foi identificado por microscopia eletrônica e morfológicamente caracterizado por pequenas vesículas originadas de plaquetas, denominadas de “poeira de plaquetas” por WOLF (1967).

A primeira evidência da capacidade funcional das VEs foi demonstrada por PETER WOLF em 1967. Em seu estudo, que pretendia explicar o trabalho de CHARGAFF e WEST (1946), observou que em amostras de plasma livre as plaquetas possuíam capacidade de gerar trombina. Em 1970, WEBBER e JOHNSON apresentaram a eletromiografia do brotamento de partículas por plaquetas ativadas (Figura 1). Nos anos seguintes, os trabalhos de PALADE (1975) e ROTHMAN contribuíram para o delineamento do papel das vesículas na via de secreção do transporte de proteínas intracelulares, especialmente enzimas, hormônios e neurotransmissores; apontando evidências para outras vias (FRIES e ROTHMAN, 1980; ROTHMAN, 2002). Posteriormente, foi demonstrado que reticulócitos empacotam o receptor para transferrina no interior de vesículas, possibilitando a maturação em eritrócitos (PAN & JOHNSTONE, 1983). E finalmente em 1985, os autores provaram que essa transferência era mediada por exossomos (PAN *et al.*, 1985). Assim, nas décadas seguintes, poucas pesquisas foram realizadas e somente nos últimos 20 anos sofreu expansão.





**Figura 1.** Eletromicrografia de plaquetas ativadas liberando microvesículas por brotamento de membrana plasmática. A imagem foi reproduzida a partir de WEBBER e JOHNSON, 1970. © 1970, American Society for Investigative Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

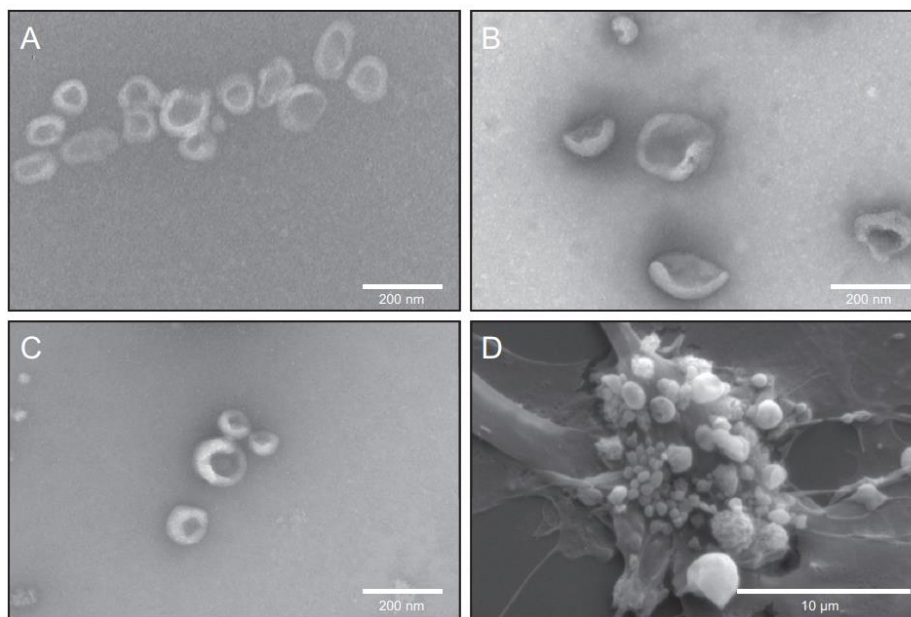
## 1.2. Nomenclatura e classificação

As VEs circulam nos espaços extracelulares e fluidos biológicos e são diferenciadas de acordo com a sua biogênese, suas proteínas marcadoras de membrana e proteínas internas, sua densidade de flutuação em gradiente de densidade e o seu tamanho (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013). A diversidade de caracterização das vesículas, somadas ao interesse do meio acadêmico e aumento dos estudos nessa área, e ao fato de que cada tipo de célula pode liberar um conjunto heterogêneo de vesículas, resultou na dificuldade da adoção de uma nomenclatura padronizada para as VEs.

As vesículas são liberadas por células de mamíferos (COSTA-SILVA *et al.*, 2015), bactérias gram-negativas (LI *et al.*, 1998) e gram-positivas (LEE *et al.*, 2009), fungos (RODRIGUES *et al.*, 2008), leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2010), parasitas unicelulares como o protozoário causador da malária (COUPER *et al.*, 2010), células de plantas (DÖRMANN *et al.*, 2014), nematódeos (MAIZELS *et al.*, 2012) e moscas (GROSS *et al.*, 2012).

Desse modo, até o ano de 2012 não havia um critério bem estabelecido na literatura em relação a nomenclatura para as VEs, o que levava os pesquisadores a nomeá-las de acordo

com a célula que as originou (VAN DER POL *et al.*, 2015): tolerossomos (células do epitélio intestinal), oncossomos (células tumorais), prostassomos (células da próstata), dexossomos (células dendríticas) e vesículas de matriz (osteoblastos e cartilagem) (OSTMAN *et al.*, 2005; DI VIZIO *et al.*, 2009; RONQUIST, 2015; LE PECQ, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2015). Outros termos são associados ao mecanismo de biogênese, como exossomos, microvesículas, micropartículas (COCUCCI *et al.*, 2009; THÉRY *et al.*, 2009; BEYER e PISETSKY, 2010; MATHIVANAN *et al.*, 2010) e corpos apoptóticos (THÉRY *et al.*, 2009; BEYER e PISETSKY, 2010; MATHIVANAN *et al.*, 2010) têm sido empregados como sinônimos e com significados distintos entre os pesquisadores (Figura 2).

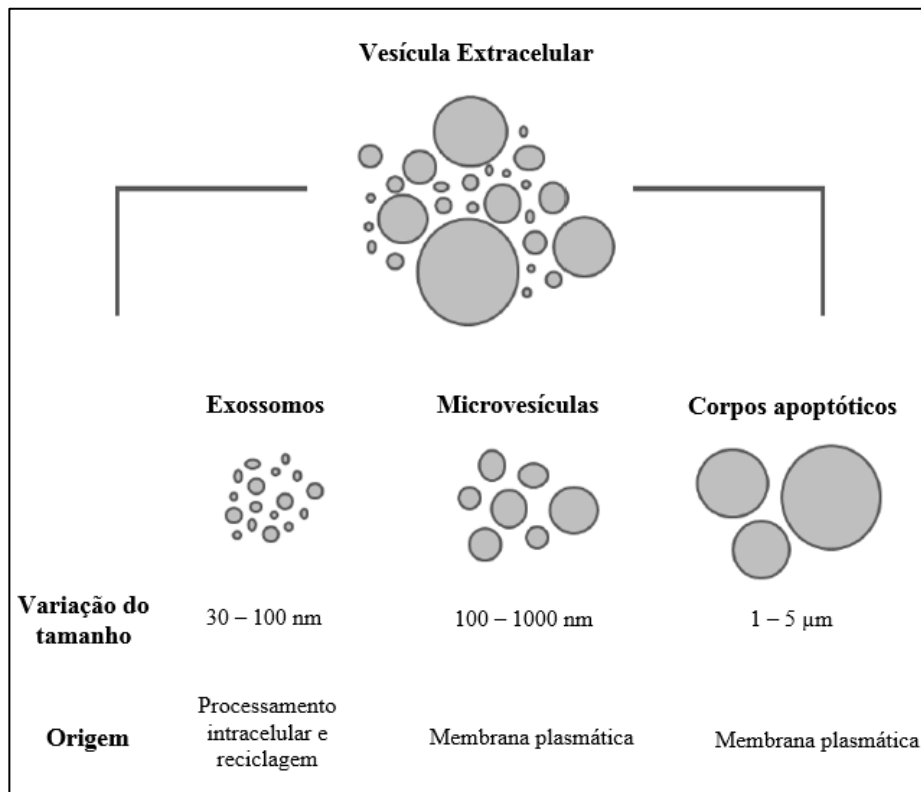


**Figura 2.** Eletromicrografia de transmissão de vesículas derivadas de células humanas isoladas por centrifugação diferencial a partir de amostras de plasma (A; exossomos, diâmetro <100 nm), de urina (B; microvesículas, diâmetro >100 nm), de saliva (C; exossomos e partículas de membrana, diâmetro <100 nm) Na imagem D (eletromicrografia de varredura), tem-se célula endotelial da veia umbilical humana liberando vesículas apoptóticas. A imagem foi reproduzida a partir de VAN DER POL *et al.*, 2012.

Ademais, os termos “ectossomos”, “partículas de membrana” e “vesículas exossomo-like” são designadas a partir de características físico-químicas, incluindo o tamanho, densidade, aparência na microscopia, sedimentação, composição lipídica, principais marcadores proteicos de superfície e origem subcelular (THÉRY *et al.*, 2009).

Finalmente, em 2014, a “*International Society of Extracellular Vesicles (ISEV)*”, encorajou o uso do termo VEs para caracterizar todas as vesículas secretadas por diferentes tipos celulares e que os pesquisadores forneçam subsídios claros ao reportar a população de VEs em cada área de investigação (GOULD & RAPOSO, 2013; LÖTVALL *et al.*, 2014),

sendo adotado como consenso três classes de VEs: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Figura 3).



**Figura 3.** Sumário da nomenclatura de VEs. O termo VE é amplo e refere-se a todas as vesículas secretadas por células e suas populações incluem os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Adaptado de GYÖRGY *et al.*, 2011.

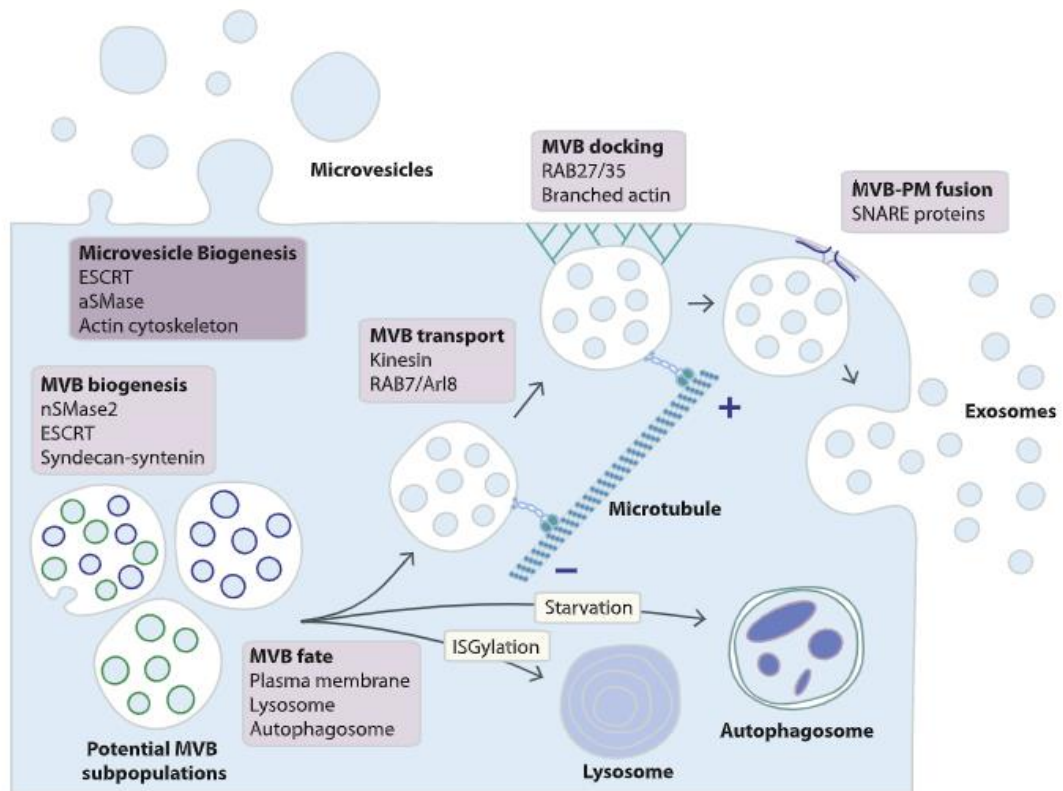
Os exossomos são vesículas derivadas de células presentes em quase todos os fluidos biológicos, como urina, sangue, ascites e fluido cefalorraquidiano (PISITKUN *et al.*, 2004; CABY *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2006; VELLA *et al.*, 2008); soro e plasma, meio de cultura celular. São vesículas de bicamada lipídica, apresentam diâmetro entre 30 a 130 nm e flutuação em gradiente de densidade de sacarose no plasma entre 1,15 e 1,27 g/ml-1 e em células em cultura entre 1,13 – 1,19 g/mL-1 (CABY *et al.*, 2005). Possuem proteínas envolvidas no transporte e fusão da membrana, como a Rab, GTPases, anexinas e flotilina; componentes do Complexo Endossomal requerido para o Transporte (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*, ESCRT), tais como a Alix, gene de susceptibilidade tumoral (TSG101), proteínas de *heat shock* (HSPs), integrinas e tetraspaninas, incluindo a CD63, CD81 e CD82 (COCUCCI *et al.*, 2009; SIMONS e RAPOSO, 2009; THÉRY *et al.*, 2009; BEYER e PISETSKY, 2010; MATHIVANAN *et al.*, 2010; BOBRIE *et al.*, 2011; CHAPUT e THÉRY, 2011; RECORD *et al.* 2011).

As vesículas secretadas durante o estresse celular a partir da membrana plasmática

são designadas como vesículas celulares, termo também usado para descrever populações totais de vesículas isoladas de fluidos biológicos (NIEUWLAND *et al.*, 1997; HEIJNEN *et al.*, 1999; BEYER e PISETSKY, 2010). Possuem maior tamanho quando comparadas aos exossomos, com diâmetro variando entre 100 nm e 1,0 µm (THÉRY *et al.*, 2009). Porém, alguns estudos mostram variações no diâmetro de vesículas obtidas de plasma humano aliado ao uso de diferentes técnicas de isolamento, por exemplo, WOLF (1967) e TURIÁK e colaboradores (2011) mostraram, respectivamente, vesículas com diâmetros variando entre 20 50 nm e 200 a 800 nm por meio de MET. DRAGOVIC e colaboradores (2011) observaram vesículas com tamanho médio de 80 nm utilizando *Nanotracking Particle Analysis* (NTA). Nota-se, dessa forma, que há uma sobreposição de exossomos e microvesículas em amostras, sendo difícil a sua separação baseada no tamanho e forma, porque ambas podem apresentar a morfologia de “taça” (*cup-shaped*) no MET (Figura 2). As partículas de membranas, menos estudadas, possuem origem na membrana plasmática de células epiteliais, estão presentes em fluidos corporais em contato com o epitélio como a saliva, urina e fluido seminal e coexistem com exossomos na saliva (MARZESCO *et al.*, 2005; BERCKMANS *et al.*, 2011). Apresentam o mesmo diâmetro dos exossomos, porém com menor densidade (1.032 – 1.068 g/mL) em gradiente de sucrose e não expressam o marcador de superfície CD63 (MARZESCO *et al.*, 2005). Os corpos apoptóticos, por sua vez, são vesículas que frequentemente expõem fosfatidilserina, liberadas após a apoptose celular. Apresentam diâmetro variando entre 1 a 5 µm, densidade de 1.16 a 1.28 g/mL e com morfologia tipicamente heterogênea ao MET (KERR *et al.*, 1972; THÉRY *et al.*, 2001; HRISTOV *et al.*, 2004; TURIÁK *et al.*, 2011).

### **1.3. Biogênese**

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese das vesículas extracelulares é um aspecto importante na sua classificação, resultando na sua liberação a partir de corpos multivesiculares com a membrana plasmática ou via brotamento e fissão da membrana plasmática (AKERS *et al.*, 2013). A biogênese das vesículas extracelulares usualmente ocorre pela via clássica, com a formação do exossomo e, pela via direta, por brotamento e fissão da membrana plasmática, entretanto, não fica limitada a somente as duas (Figura 4). BOOTH *et al.* (2006) mostraram que certas células possuem domínios da membrana plasmática que são enriquecidas com proteínas exossomais e endossomais, capazes de reter a propriedade endossomal durante o brotamento e mediando, assim, a biogênese de exossomos.



**Figura 4.** Representação esquemática das vias de biogênese de vesículas extracelulares. As microvesículas (MVs) brotam diretamente a partir da membrana plasmática, enquanto os exossomos tem origem dentro da subpopulação de corpos multivesiculares (*multivesicular bodies*, MVBs) que quando maduros, fundem-se com a membrana plasmática. Alternativamente, a via de MVBs inclui a fusão com lisossomos ou autofagossomos, embora pouco se saiba sobre esse mecanismo. A fusão do MVB com a membrana plasmática é regulada por um processo complexo que inclui o tráfego de MVB ao longo de microtúbulos até a membrana plasmática e a fusão mediada por SNARE. A imagem foi reproduzida a partir de BEBELMAN *et al.*, 2018.

### 1.3.1 Via Clássica

Os exossomos são formados pela via endossomal a partir da invaginação da membrana citoplasmática do endossomo primário, dando origem aos compartimentos multivesiculares internos (do inglês, *Multivesicular Bodies*, MVBs,) na célula. Estes MVBs formam vesículas internas nas células chamadas de vesículas intraluminais (ILVs). Após a fusão dos MVBs com a membrana plasmática ocorre a liberação das ILs no espaço extracelular, quando passam a ser chamadas exossomos (COLOMBO *et al.*, 2014). Já foram descritos diferentes mecanismos da biogênese de MVBs, porém o papel crucial de microdomínios de membrana (do inglês, *lipid raft*) em sua formação foram estabelecidos por TRAJKOVIC *et al.* (2008). A formação de ILVs é direcionada pelo *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) que possui quatro complexos principais: 0, I e II

– reconhecem e ubiquitinam proteínas endocitadas na membrana intracelular da vesícula e, o complexo ESCRT III (inclui Alix e TSG101) responsável por orquestrar a invaginação e cisão da ILV para formar os MVBs.

Embora a origem de subpopulações de MVB não esteja totalmente elucidada, estudos apontam para o papel de lipídios em um processo independente de ESCRT. Verificou-se que MVBs ricos em colesterol eram destinados à liberação como exossomos (MOBIUS *et al.*, 2003). Além disso, a associação de proteínas exossômicas com microdomínios de jangada lipídica foi encontrada para segregar MVBs para a secreção de exossomos em vez de degradação lisossômica (BABST *et al.*, 2005). A ceramida também foi detectada dentro dos exossomos, que é hidrolisada a partir da esfingomielina fosfolipídica pelas enzimas esfingomielinase. A adição de esfingomielinases exógenas às células induziu a agregação de microdomínios de jangada lipídica em vesículas intracelulares e brotamento interno, produzindo ILVs. Além disso, a inibição das esfingomielinases reduziu a secreção de marcadores exossômicos, como as tetraspaninas e TSG101 (MARSH e VAN MEER, 2008), sugerindo um papel para a ceramida na produção de ILVs destinadas à secreção de exossomos. No entanto, outros demonstraram que a inibição das esfingomielinases tem pouco ou nenhum efeito sobre a secreção do exossomo (TRAJKOVIC *et al.*, 2008), sugerindo que esse processo pode ser específico para células. As tetraspaninas, particularmente o CD63, também foram propostas como estimuladoras independentes do ESCRT para a formação de ILV e secreção de exossomos (BUSCHOW *et al.*, 2009; BOBRIE *et al.*, 2011) e são conhecidas por serem enriquecidas em ILVs e exossomos (SAVINA *et al.*, 2005). A fosfolipase D2 (PLD2), que é altamente enriquecida em exossomos, é necessária para a formação de ILVs contendo CD63 (WHITE *et al.*, 2006). O PLD2 tem como alvo a fosfatidilcolina (PC) na membrana plasmática para produzir ácido fosfatídico que, similarmente à ceramida, tem sido implicado na formação de MVBs. Recentemente, mecanismos independentes e dependentes do ESCRT mostraram formar ILVs de diferentes tamanhos (HSU *et al.*, 2010), fornecendo um método potencialmente simples de distinguir populações de ILV.

### **1.3.2 Via Direta**

As microvesículas possuem tamanho bastante heterogêneo, variando entre 50 nm a > 10 µm e por essa razão, podem ser originadas por mecanismos diversos e múltiplos. No estado de repouso, quando as células não estão sob estímulo, a bicamada fosfolipídica

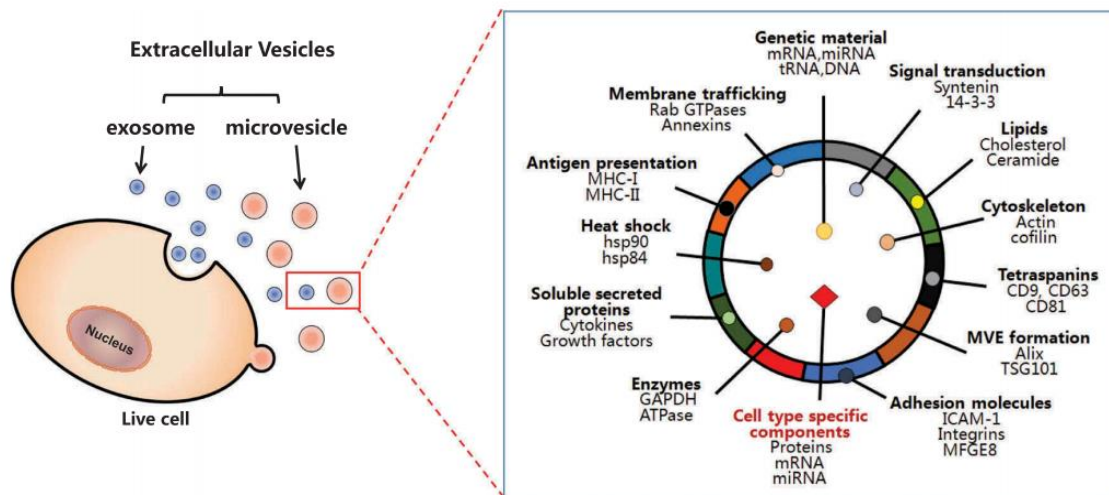
encontra-se assimétrica (MANNO *et al.*, 2002), mantida pela síntese de fosfolipídeos em um arcabouço específico da membrana e pela presença de três enzimas translocase – flipase, flopase e escramblase. A ativação da célula resulta no aumento de cálcio citosólico que regula a função dessas enzimas, o que promove a exposição de fosfatidilserina aminofosfolipídeo, localizado na porção citoplasmática da bicamada lipídica (SEIGNEURET *et al.*, 1984; DALEKE, 2003). Somado a essa condição, a clivagem da actina no citoesqueleto dessa célula ativada promove o brotamento e liberação da membrana plasmática na forma de microvesículas. A maquinaria ESCRT está envolvida na produção de nanovesículas enriquecidas com proteínas de superfície celular, reflexo de sua origem na membrana plasmática (NABHAN *et al.*, 2012; WANG e LU, 2017). Além disso, similar ao papel da esfingomielina fosfatidierase, nSMase2, na formação de ILs, a esfingomielinase ácida induz a produção da microvesícula dependente de ceramida, indicando a sua participação na biogênese de EVs derivadas de MBVs e membrana plasmática (BIANCO *et al.*, 2009).

#### **1.4. Composição das vesículas extracelulares**

A heterogeneidade na biogênese das VEs relaciona-se diretamente à sua composição, embora possuam a mesma origem celular. Ademais, ainda é um desafio afirmar a presença de apenas um tipo de vesícula em uma preparação, existindo subpopulações entre os exossomos e as microvesículas, na qual cada subpopulação contém proteínas de membrana específicas e carregamentos específicos (TKACH e THÉRY, 2016). Os exossomos são enriquecidos com a presença de alguns componentes de tráfego, como a Tsg101, Alix e tetraspaninas (CD63, CD9 e CD81), desse modo, indica que poderiam ser utilizados como marcadores específicos (MATHIVANAN *et al.*, 2010; LÖTVALL *et al.*, 2014; MINCIACCHI *et al.*, 2015; KEERTHIKUMAR *et al.*, 2015). Porém, o estudo de KOWAL e colaboradores (2016) demonstrou a presença de CD63, CD9 e CD81 em uma subpopulação de pequenas VEs derivadas da membrana plasmática, revelando que as tetraspaninas são marcadores genéricos para as VEs. As microvesículas, em contrapartida, diferentemente dos exossomos, possuem composição molecular menos definida. A depender do tipo celular que a secretou podem ser enriquecidas com metaloproteinases, glicoproteínas e Mac-1 (MARTINEZ DE LIZARRONDO *et al.*, 2012; FALATI *et al.*, 2003; MEZOUAR *et al.*, 2015; PLUSKOTA *et al.*, 2008; MURALIDHARAN-CHARI *et al.*, 2010).

Todas as VEs compartilham uma característica composição de biomoléculas:

proteínas, lipídeos (colesterol) (LAULAGNIER *et al.*, 2005; TRAJKOVIC *et al.*, 2008; LLORENTE *et al.*, 2013), material genético (p.ex. mRNA, miRNA, tRNA e DNA) e metabólitos de baixo peso molecular (p.ex. aminoácidos, ATP etc) (VALADI *et al.*, 2007; MITTELBRUNN *et al.*, 2011; NOLTE-THOEN *et al.*, 2012; MONTECALVO *et al.*, 2012; VAN DEN BOORN *et al.*, 2013; RAIMONDO *et al.*, 2011).



**Figura 5.** Composição molecular de uma típica vesícula extracelular inclui material genético, proteínas e lipídeos. As proteínas de EVs incluem proteínas transmembrânicas e extracelulares associadas a lipídeos (p.ex. tetraspaninas, moléculas de adesão celular), proteínas citosólicas (p.ex. envolvidas na biogênese do endossoma multivesicular e transdutoras de sinais), proteínas intracelulares (p.ex. HSP90), proteínas extracelulares (p.ex. fibronectina) etc. A imagem foi reproduzida a partir de WEN *et al.*, 2017.

### 1.4.1 Marcadores proteicos

Os marcadores canônicos das VEs estão associados à sua origem e função, podendo ser divididos em quatro categorias, baseado na recomendação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares: (i) proteínas transmembrana ou ligada a lipídeo extracelular que estão enriquecidas em isolados de VEs, incluem as tetraspaninas (CD63, CD9 e CD81), integrinas, moléculas de adesão celular, receptores para fatores de crescimento, proteínas heterodimérica G (GNA) etc; (ii) proteínas citosólicas com capacidade de ligação a membrana ou receptor e presentes em isolados de VEs, tais como, aquelas envolvidas na formação do endossoma multivesicular (Tsg101, anexina, Rabs) e na transdução de sinal (sintenina); (iii) proteínas intracelulares associadas a outros compartimentos na membrana plasmática e endossomos que estão ausentes ou pouco representadas em VEs, como as proteínas do retículo endoplasmático (HSP90B1, calnexina), componentes do Golgi (GM130), proteínas de mitocôndria (citocromo C) e do complexo argonauta/RISC (AGO)



e; (iv) proteínas que ligam-se especificamente ou não às membranas e são co-isoladas com VEs, como por exemplo a acetilcolinesterase (AChE), albumina sérica, proteínas de matriz extracelular (fibronectina e colágeno), proteínas solúveis secretadas (citocinas, fator de crescimento, metaloproteinases de matriz). Além desses, as VEs carregam uma variedade de marcadores específicos da célula secretora que auxiliam na identificação da origem da vesícula (Tabela 1).

Cada proteína marcadora pode estar presente em alguns subtipos de VEs e não em outros (TKACH e THÉRY, 2016). Histonas, proteossoma e componentes do ribossomo são provavelmente liberados em VEs com diâmetro maior, derivadas da membrana plasmática e/ou vesículas apoptóticas, e não em exossomas (SCHILLER *et al.*, 2008).

As análises proteômicas viabilizaram a identificação de vários marcadores moleculares das vesículas extracelulares e a criação de banco de dados específicos. O primeiro a surgir foi o ExoCarta, no ano de 2009. ExoCarta compilava moléculas proteicas e RNA identificados em exossomos e está disponível para acesso por meio do site <http://exocarta.ludwig.edu.au> (MATHIVANAN e SIMPSON, 2009). Em 2012, o *Vesiclepedia* (<http://www.microvesicles.org>) substituiu o *ExoCarta* por permitir avaliar manualmente dados moleculares de lipídeos, RNA e proteínas, identificados em diferentes classes de VEs oriundos de mais de 300 estudos independentes publicados ao longo dos últimos anos (KALRA *et al.*, 2012). No ano de 2013, foi criado um banco de dados de vesículas extracelulares de organismos procariotos e eucariotos, o *EVpedia* (<http://evpedia.info>) que fornece conjuntos de dados em larga escala de componentes vesiculares – proteínas, mRNAs, miRNAs e lipídeos, presentes em VEs de procariontes, eucariontes não-mamíferos e mamíferos (KIM *et al.*, 2013). Adicionalmente, objetivando a padronização do uso de métodos analíticos validados e de parâmetros experimentais adequados, a ISEV estabeleceu, em 2014, as diretrizes contendo informações mínimas para os estudos com VEs (do inglês *Minimal Information for studies of extracellular vesicles* MISEV) (WITWER *et al.*, 2013; LÖTVALL *et al.*, 2014). Contudo, o número de pesquisas sobre a temática tem dificultado a adoção dessas diretrizes. Dessa forma, um consórcio internacional implementou a plataforma EV-TRACK pautada em sete aspectos: comunidade, inquérito, métodos, biologia de VEs, *coaching*, VE-métrica e upload; desenvolvido para criar o diálogo entre os pesquisadores sobre os parâmetros experimentais de relevância, melhorar o rigor e interpretação dos experimentos com VEs e registrar a evolução da pesquisa com VEs (DEUN *et al.*, 2017)

**Tabela 1.** Marcadores específicos de células utilizados na análise de VEs de fluidos biológicos para identificar a sua origem celular.

<b>TIPO CELULAR</b>	<b>MARCADOR/ANTÍGENO</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>
Linfócitos B	BCR, CD19	CHAPUT e THÉRY, 2011; GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015.
Células dendríticas	CD11c	CHAPUT e THÉRY, 2011
Células endoteliais	CD31, CD62E, CD144, CD146	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015; CONNOLLY <i>et al.</i> , 2014; CHRISTERSSON <i>et al.</i> , 2013; AGOUTI <i>et al.</i> , 2015; BURTON <i>et al.</i> , 2013; JAYACHANDRAN <i>et al.</i> , 2012; SHAH <i>et al.</i> , 2008.
Eritrócitos	CD235a, CD236	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015; CONNOLLY <i>et al.</i> , 2014; CHRISTERSSON <i>et al.</i> , 2013; AGOUTI <i>et al.</i> , 2015; SHAH <i>et al.</i> , 2008; WEISS <i>et al.</i> , 2015.
Leucócitos	CD15, CD45	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015; AGOUTI <i>et al.</i> , 2015; WEISS <i>et al.</i> , 2015.
Monócitos	CD11b, CD14	WEISS <i>et al.</i> , 2015; SHAH <i>et al.</i> , 2008; ALEMAN <i>et al.</i> , 2011.
Plaquetas	CD41, CD42a, CD42b, CD61	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015; CONNOLLY <i>et al.</i> , 2014; CHRISTERSSON <i>et al.</i> , 2013; AGOUTI <i>et al.</i> , 2015; JAYACHANDRAN <i>et al.</i> , 2012; WEISS <i>et al.</i> , 2015; SHAH <i>et al.</i> , 2008; ALEMAN <i>et al.</i> , 2011; CONNOR <i>et al.</i> , 2010.
Reticulócitos	CD71	AGOUTI <i>et al.</i> , 2015.
Linfócitos T	CD2, CD3, CD86	CHAPUT e THÉRY, 2011; GUSTAFSON <i>et al.</i> , 2015.

#### **1.4.2 RNA**

A presença de RNA no conteúdo molecular de vesículas extracelulares é bastante recente (VALADI *et al.*, 2007). Esse artigo mostrou a presença tanto de RNA mensageiro quanto microRNAs em exossomos derivados de linhagem celular de mastócitos humanos e murinos. Esses dois tipos de RNAs podem ser transferidos de um mastócito para outro, provavelmente por meio da fusão do exossomo à membrana celular do destinatário. O mRNA é funcionalmente entregue e o pode levar à tradução de novas proteínas em uma célula receptora. Utilizando microarranjos para mRNA e miRNAs foram identificados 1.300 mRNAs e 120 miRNAs nestes exossomos derivados de mastócito, esses RNAs parecem ser específicos dos exossomos, já que não foram detectados nas células doadoras. Além disso, foi demonstrado em experimentos *in vitro* que o mRNA transportado por exossomos de mastócito de camundongos são funcionalmente entregues, pois, quando adicionados a células de mastócitos humanos levam a tradução de proteínas de camundongos nas células humanas. O RNA transportado entre as células via exossomas recebeu a denominação de

*exosomal shuttle* RNA (esRNA) (VALADI *et al.*, 2007). A partir deste estudo pioneiro, as VEs foram purificadas da maioria dos tipos celulares e de fluidos biológicos como saliva (PALANISAMY *et al.*, 2010), urina (PISITKUN *et al.*, 2004), leite materno (ADMYRE *et al.*, 2007), soro (ALMQVIST *et al.*, 2008), plasma (CABY *et al.*, 2005) e fluidos nasal (LÄSSER *et al.*, 2011), brônquico (QAZI *et al.*, 2010), seminal (GATTI *et al.*, 2005) e amniótico (KELLER *et al.*, 2007). Ademais, houve um aumento expressivo de publicações na área da imunologia dos tumores, inspirados pela hipótese de que os miRNAs, no interior de VEs, poderiam desencadear ação semelhante aos hormônios no microambiente tumoral. A presença de mRNA em VEs produzidas pelas células maternas e secretadas no leite materno, sugere a transferência pós-natal de material genético materno para o neonato (IRMAK *et al.*, 2012).

Em 2011, a aplicação terapêutica de VEs foi demonstrada por ALVAREZ-ERVITI e colaboradores. Exossomos obtidos a partir de células dendríticas foram carregados com pequenos RNA e sistematicamente injetados em camundongos. Os exossomos continham uma proteína que os permitia translocar para a região cerebral e silenciar genes específicos, incluindo um gene alvo para a terapia da doença de Alzheimer. Dessa forma, o conhecimento da capacidade que VEs possuem de carrear ácidos nucleicos funcionais fornece promissora perspectiva no seu uso como alvo terapêutico, como também na potencial identificação de biomarcadores para doenças atuais.

### **1.4.3 Lipídeos**

Os mediadores lipídicos são menos estudados, embora sejam precursores de inúmeras vias de sinalização celulares. A análise de sua composição em VEs derivadas de mastócitos, células dendríticas e linfócitos B revelam um enriquecimento de esfingomiéline quando comparado com as células, sugerindo a reserva de ceramida para a biogênese do exossomos (LAULAGNIER *et al.*, 2004; WUBBOLTS *et al.*, 2003). A análise dos lipídeos de VEs tem se tornado mais popular com o uso de técnicas como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O estudo de ZAKHAROVA e colaboradores (2007) mostrou diferenças na composição lipídica entre subpopulações de VEs derivadas de plaquetas. A padronização e adequação das técnicas empregadas para a investigação do conteúdo lipídico de vesículas extracelulares poderá auxiliar na realização de estudos alternativos que não sejam baseados na proteômica ou detecção de ácido nucleico.

#### **1.4.4 Pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs)**

Após mais de uma década do sequenciamento do primeiro genoma humano no ano de 2003, ficou evidenciado que apenas uma pequena parcela do DNA (aproximadamente 1,5%) presente no genoma humano é transcrito em RNA mensageiro e traduzido em proteínas (LANDER, 2011). Contudo, aproximadamente 80% do genoma tem capacidade de transcrever moléculas de RNA não codificadores (ncRNAs) de proteínas que participam do metabolismo celular (CONSORTIUM, 2012), envolvidos na regulação da expressão gênica tanto em nível pós-transcricional quanto, genômico. Dentre os ncRNAs mais bem estudados destaca-se os RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportadores (tRNA) e microRNAs (miRNAs) (ESTELLER, 2011). Os microRNAs (miRNA) são RNAs de fita simples, não codificadores de proteínas e com tamanho aproximado de 22 nucleotídeos. Estão envolvidos na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, sendo encontrados em plantas, animais e alguns vírus (BARTEL, 2009). Controlam genes envolvidos em vários processos biológicos, entre eles, apoptose, proliferação, diferenciação, metástase (ALMEIDA *et al.*, 2011) e em células de mamíferos desempenham papéis importantes no desenvolvimento humano, na diferenciação celular, homeostase, na adaptação ao meio ambiente, ontogênese, e nas interações das células hospedeiras com agentes patogênicos (HA, 2011; MA *et al.*, 2011).

#### **1.5. Captura e tráfico de vesículas extracelulares**

As bases moleculares e celulares envolvidas no direcionamento e captura de VEs ainda não está totalmente elucidado, porém alguns aspectos dependentes das células-alvo já são sugeridos. O processo muito provavelmente tem início com a interação entre a VE e a célula-alvo. A fosfatidilserina (PS) presente em VEs derivadas de linfócitos T é reconhecida por macrófagos e, sua consequente internalização, resulta no acúmulo de colesterol e TNF- $\alpha$  (ZAKHAROVA *et al.*, 2007), porém mesmo quando inibida, o mecanismo é mantido, indicando a participação de outras moléculas. As integrinas expressas em vesículas derivadas de células endoteliais progenitoras e de células dendríticas (DEREGIBUS *et al.*, 2007; BUSCHOW *et al.*, 2009) medeiam a internalização de VEs e podem ainda, se complexar com a tetraspanina Tspan 8 na superfície da VE contribuindo com o reconhecimento das VEs (RANA *et al.*, 2012). VEs derivadas de DCs maduras, expressando MHC II e ICAM-1 (*Intercelular Adhesion Molecule 1*), podem ser recrutadas por DCs

adjacentes com auxílio de LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated antigen 1*), integrina de linfócitos (SEGURA *et al.*, 2007). A endocitose e fagocitose, como também a fusão direta com a membrana da célula-alvo são mecanismos de internalização das VEs (MULCAHY *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2010).

### **1.6. Vesículas extracelulares e sua ação sobre o sistema imunológico**

A comunicação celular influencia diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo respostas imunológicas (ROBBINS e MORELLI, 2014; NOLTE-HOEN e WAUBEN, 2012), câncer (TICKNER *et al.*, 2014) e doenças cardiovasculares (JANSEN *et al.*, 2017); além de entrega de fatores de virulência bacteriana ao hospedeiro (BOMBERGER *et al.*, 2009) e a modulação de respostas inflamatórias e imunitárias na comunicação feto-mãe (KSHIRSAGAR *et al.*, 2012). É realizada entre diferentes tipos celulares, porém quando envolve a participação de células do sistema imunológico ou moléculas por elas secretadas, tem maior projeção na literatura pela sua capacidade imunomodulatória. A descoberta de que as vesículas extracelulares atuam como veículos de transferência de membrana, proteínas citosólicas, lipídeos e RNA entre as células sugerem fortemente a sua contribuição como interlocutoras na comunicação celular. Quando secretadas por células do sistema imune apresentam função imunomodulatória, induzindo tanto a supressão quanto a ativação de respostas imunes (FERNÁNDEZ-MESSINA *et al.*, 2015).

Conforme mencionado anteriormente, o tráfego de membrana entre as DCs e exossomos é fato e, ademais, os antígenos carregados por essas vesículas podem ser reprocessados para apresentação ou transferido diretamente para a membrana da célula-alvo, processo denominado de *cross-dressing* (HAO *et al.*, 2007; ROBBINS e MORELLI, 2014). Nesse estudo, o foco será dado às vesículas derivadas de células imunológicas, especialmente as VEs liberadas por DCs, e que possuem capacidade de modular atividades em linfócitos, macrófagos e DCs.

A função principal das DCs é o processamento e a apresentação, de modo extremamente eficiente, de antígenos endógenos e exógenos no contexto do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I e II. Posteriormente, o processo de migração para o linfonodo é concomitante a outro processo imprescindível para essa célula, a sua diferenciação, induzida por citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 e compostos bacterianos, como LPS. As DCs existem em dois estados de maturação: DCs imaturas (iDC), eficientes na fagocitose e endocitose, mas não na ativação de linfócitos T e; DCs maduras (mDC),

extremamente eficazes na ativação de linfócitos T devido à redução da sua capacidade de endocitose e fagocitose (pela diminuição dos receptores com essa função); aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, como CD11b, CD40, CD58, CD80 e CD86, além do aumento da expressão da molécula do MHC de classe II, que viabiliza a apresentação do antígeno processado para o linfócito T CD4<sup>+</sup> virgem (THÉRY *et al.*, 1999; BANCHEREAU *et al.*, 2000; WÜTHRICH *et al.*, 2012). A proliferação e a polarização das diferentes subpopulações de linfócitos T dependem do tipo de estímulo, do processamento, da apresentação de antígenos e conseqüentemente das citocinas secretadas pelas DCs maduras (SAID e WEINDL, 2015). Dentre as subpopulações de linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2 são dois perfis diferentes, adequados para patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente. Essas populações estão associadas a padrões de citocinas distintos. A produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-18 está relacionada com a predominância de linfócitos Th1 e a conseqüente produção de IFN- $\gamma$ , que é uma citocina importante para regular a atividade das imunidades inata e adaptativa e um potente ativador da função microbicida de fagócitos, sendo essencial para a resistência contra bactérias, fungos e parasitas intracelulares. Já a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13 está relacionada com a predominância de linfócitos Th2 (CALICH *et al.*, 2008).

As células dendríticas (DCs) são elementos chave na regulação da resposta imune adaptativa. Durante o seu desenvolvimento, as DCs sofrem inúmeras mudanças que impactam em seu funcionamento. As células dendríticas imaturas (iDCs) podem ser ativadas por vários estímulos durante a sua maturação, como o microbiano, que resulta no aumento da capacidade de estimular respostas mediadas por linfócitos T (NOLTE-'T HOEN e WAUBEN, 2012). Contudo, ainda é incerto afirmar se as diferenças na função de DCs imaturas ou maduras/ativadas é reflexo da ação de vesículas liberadas por essas células. A presença de ambas moléculas de MHC I e II e proteínas coestimulatórias (CD86) nas vesículas derivadas de DCs imaturas indicam um possível papel na ativação da resposta imunológica. Vesículas extracelulares derivadas de DCs carregadas com antígenos tumorais, já foram utilizadas em estudos clínicos como estratégia de vacina anti-tumoral (ESCUDIER *et al.*, 2005). Ademais, a composição das vesículas secretadas não é estática, mas pode ser regulada por células em resposta a gatilhos extracelulares, como por exemplo, a ativação de DCs com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) que estimula a produção de VEs com aumento na expressão de MHC II (SEGURA *et al.*, 2005).

Vesículas secretadas por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas e linfócitos B, contém os componentes necessários para a ativação de linfócitos

T. Um dos estudos pioneiros envolvendo exossomos mostrou a participação destas vesículas na apresentação de antígenos (RAPOSO *et al.*, 1996). Observou-se por meio de microscopia eletrônica que exossomos liberados por linfócitos B continham moléculas de MHC de classe II, resultado da fusão entre compartimentos endossomais de células apresentadoras de antígenos com a membrana plasmática. Além disso, as vesículas secretadas, isoladas do meio de cultura, mostraram composição global de proteínas de superfície significativamente diferente da composição daquelas da membrana plasmática e, eram que os exossomos provenientes de linfócitos B humano e murino induziram respostas em células T restritas a MHC classe II (RAPOSO *et al.*, 1996). Dois anos mais tarde, um estudo de ZITVOGEL e colaboradores (1998) mostrou que as células dendríticas, envolvidas indução da resposta adaptativa de linfócitos T por meio de apresentação antigênica no contexto do MHC, secretam exossomos que poderiam promover a indução de respostas imunológicas antitumorais dependente de linfócitos T CD8+ em camundongos *in vivo*.

Após estes estudos, outros autores demonstraram que as moléculas de exossomos positivas para MHC podem induzir respostas de células T, tanto diretamente quanto indiretamente. Após a captura antigênica, as células dendríticas secretam exossomos que expõem as moléculas do MHC e as coestimulatórias para ativação de linfócitos T. Embora a ativação de linfócitos T CD4+ específica seja induzida por injeção do antígeno ou exossomos derivados de DCs expondo tais antígenos *in vivo*, essa resposta ocorre apenas na presença de DCs maduras *in vitro*, sugerindo que a troca de complexos MHC-peptídeo entre subpopulações de células dendríticas por exossomos derivados dessas células pode ser um pré-requisito para indução de uma eficiente resposta de linfócito T específica *in vivo*. Desse modo, o mecanismo mediado por exossomo pode amplificar o início da resposta imunológica adaptativa primária (THÈRY *et al.*, 2002). Ademais, exossomos derivados de células dendríticas transferem complexos funcionais de MHC classe I-peptídeo a outras DCs na presença de células dendríticas maduras (mDCs) para ativar eficientemente linfócitos T citotóxicos *in vivo* (ANDRÉ *et al.*, 2004).

A função de vesículas extracelulares derivadas de DCs pode ser altamente dependente da célula receptora e das condições do ambiente. Além de se ligar a outra APC, a ativação de linfócitos T pode recrutar vesículas derivadas de DCs (BUSCHOW *et al.*, 2009; NOLTE-THOEN *et al.*, 2009) A presença de vesículas carreando moléculas de MHC II na membrana plasmática de linfócitos T pode promover a apresentação antigênica de linfócito T ao linfócito T, processo que resulta em supressão da respostas mediadas por tais células (TAAMS *et al.*, 1998). Além disso, as vesículas derivadas de iCDs podem ainda atenuar

respostas pró-inflamatórias (MIKSA *et al.*, 2006; MISKA *et al.*, 2009). Dessa forma, vesículas derivadas de mDCs são primariamente imunogênicas, enquanto as vesículas obtidas de iDCs podem ter efeitos tolerogênico e imunogênico, dependendo da célula-alvo e estado de ativação do sistema imune.

Os macrófagos são fagócitos amplamente distribuídos nos tecidos do organismo e estão envolvidos na defesa contra patógenos invasores, desenvolvimento tissular e homeostasia. No curso de uma infecção, essas células podem rapidamente recrutar várias células da imunidade inata e adaptativa e mediar respostas de linfócitos T CD4+, T CD8+, B e células NKT (SICA *et al.*, 2015; KUKA e IANNAcone, 2014; MARTINEZ-POMARES e GORDON, 2012). Embora a ação das citocinas seja fundamental nesse processo, estudos evidenciam a participação também de VEs derivadas de macrófagos modulando, diretamente ou indiretamente, células dendríticas e respostas de linfócitos T.

Macrófagos murinos infectados com micobactérias liberam vesículas extracelulares contendo antígenos bacterianos que foram capazes de induzir a maturação de células dendríticas derivadas da medula óssea (*Bone Marrow Dendritic Cells*, BMDCs) por aumento da expressão de CD83, CD86 e MHC-II, além da citocina IL-12p40 (GIRI e SCHOREY, 2008). Essas vesículas também induziram a proliferação e ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, *in vitro* e *in vivo*, após injeção intranasal em camundongos. A presença de DCs foi necessária para indução ótima de linfócitos T, comparada a ação de vesículas extracelulares induzidas por mastócitos e DCs (GIRI e SCHOREY, 2008). Outros dois estudos mostraram que as DCs e macrófagos são os principais alvos de vesículas extracelulares derivadas de macrófagos em camundongos. Após a injeção intranasal de VEs derivadas de células THP-1 humanas infectadas com micobactérias, observou-se a ação direta de DCs e macrófagos pulmonares (SINGH *et al.*, 2012), enquanto após a injeção subcutânea de VEs derivadas de linhagens de macrófagos murinos (RAW264.7), o alvo foram as DCs e macrófagos nos linfonodos (BHATNAGAR *et al.*, 2007; CHENG, *et al.*, 2017). Posteriormente, foi demonstrado que as vesículas extracelulares derivadas de macrófagos com o fenótipo M1 induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), por outro lado, as VEs derivadas de macrófagos M2 aumentaram a liberação de citocinas IL-4 e IL-10 (CHENG, *et al.*, 2017). Por outro lado, macrófagos não infectados liberam reduzido número de vesículas (ANAND *et al.*, 2010).

Na resposta imune adaptativa, as vesículas extracelulares derivadas de linfócitos T podem influenciar diferentes tipos celulares, as ativando ou suprimindo (NOLTE- $\tau$  HOEN e WAUBEN, 2012). A liberação de VEs em linfócitos T é constitutiva, mas o aumento de



sua secreção está relacionado ao estímulo via receptor de superfície (TCR) e influxo intracelular de cálcio (BLANCHARD *et al.*, 2002), podendo promover a apoptose de linfócitos T (MONLEÓN *et al.*, 2001), inibindo a citotoxicidade de células NK (HEDLUND *et al.*, 2011), bloqueando a ativação de linfócitos T (BUSCH *et al.*, 2008) e gerando o “*downregulation*” da resposta imunológica. Vesículas extracelulares secretadas por linfócitos T, B e células dendríticas contêm repertórios de microRNA (miRNA) diferentes das suas células de origem. Linfócitos T transferem miRNAs para células apresentadoras de antígenos por meio de VEs durante a sinapse imunológica. Os miRNAs são funcionalmente entregues e a inibição da via esfingomielinase-2 diminui a transferência de miRNAs entre as células (MITTELBRUNN *et al.*, 2011).

Outros estudos ainda demonstram o efeito protetor de VEs sobre o sistema imune. Vesículas extracelulares liberadas pelas células-tronco mesenquimais derivadas de células-tronco embrionárias humanas reduziram o tamanho do infarto de miocárdio em ratos durante lesão por isquemia/reperfusão (LAI *et al.*, 2010). Exossomos derivados de células dendríticas podem induzir tolerância em modelos de aloenxerto em ratos, efeito observado durante transplantes intestinais e cardíacos.

O avanço das investigações sobre os mecanismos de ação dos exossomos oferece uma nova visão sobre a biologia do câncer com implicações diagnósticas e terapêuticas (BRINTON *et al.*, 2014). Além de ser um reservatório de biomarcadores de câncer, elas podem ser reprojctadas para restabelecer a imunidade tumoral (BRINTON *et al.*, 2014) e utilizados na bioengenharia genética para entregar drogas ou RNAs de interferência em órgãos de difícil acesso, como o cérebro (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2011).

## **2. O PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LL-37**

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) consistem de classes de moléculas pertencentes ao sistema imunológico que atuam precocemente em resposta às infecções (HANCOCK e SCOTT, 2000). A ação desse grupo de moléculas heterogêneas oriundas de várias espécies de invertebrados, plantas e animais reduz significativamente as infecções por atividade biocida e bioestática (OPPENHEIM *et al.*, 2003). Existem mais de 800 peptídeos isolados e descritos e podem ser constituídos de 12 a 50 aminoácidos. Os PAMs são representados por conformações estruturais (folha- $\beta$ ,  $\alpha$ -hélice, estruturas em laço ou estendidas) e, em sua maioria, são catiônicos ou anfipáticos, o que determina sua atividade antimicrobiana. Estas

biomoléculas multifuncionais possuem, além de atividade antimicrobiana, influência na expressão de moléculas de adesão, secreção de íons de cloreto, produção de adrenocorticóide, angiogênese e reparo tecidual (HANCOCK e SCOTT, 2000).

A atividade antimicrobiana de peptídeos é a mais amplamente relatada na literatura. Diversos PAMs apresentam amplo espectro envolvendo bactérias Gram-positivas e negativas, leveduras, fungos, vírus, protozoários e parasitas (LOPEZ-ABARRATEGUI *et al.*, 2012). O mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ainda não está completamente elucidado em situações fisiológicas (OPPENHEIM *et al.*, 2003). Dentre os modelos de estudo aceitos, é demonstrado que estes podem causar morte celular via interferência extra ou intracelular (POWERS e HANCOCK, 2003). Os modelos estão relacionados à interferência na estrutura da membrana celular a partir do aumento da permeabilidade, formação de poros, causando perda de função ou extravasamento celular, ou ainda em nível intracelular, induzindo apoptose via interferência nuclear, dentre outros (LOPEZ-ABARRATEGUI *et al.*, 2012).

No âmbito extracelular, interações eletrostáticas medeiam interação entre peptídeo e estruturas da interface celular. A anfipaticidade é uma característica comum à maioria dos PAMs. Por conseguinte, os peptídeos interagem com a membrana citoplasmática após atravessarem os lipopolissacarídeos (Gram-negativas) e ácidos teicóico e lipoteicóico (Gram-positivas) (BROGDEN, 2005). A penetração à membrana pode formar poros com subsequente rompimento e extravasamento de fluido, causando morte celular (LEE *et al.*, 2004).

Adicionalmente a sua ação frente a micro-organismos, os PAMs apresentam ação imunomodulatória como, por exemplo, a indução ou a modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, quimiotaxia, apoptose, transcrição de genes, inibição da resposta inflamatória, recrutamento e estímulo da proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T (BOWDISH *et al.*, 2005) e ativação e diferenciação de células dendríticas (DAVIDSON *et al.*, 2004). Peptídeos catiônicos podem induzir quimiotaxia, liberação de histamina por mastócitos, promovem angiogênese e modulam a diferenciação de células dendríticas (BOWDISH *et al.*, 2005). Desse modo, as propriedades de cada peptídeo estão associadas a seu mecanismo de ação, a efetividade e especificidade, ao seu tamanho, a sequência de resíduos de aminoácidos, a sua carga, conformação, estrutura, hidrofobicidade e anfipaticidade (BROGDEN, 2005). As desvantagens do uso dessas biomoléculas podem incluir alto custo de produção (dependendo do tamanho e dos resíduos), citotoxicidade em alguns casos (GKEKA e SARKISOV, 2010), pobre penetração tecidual e

rápida eliminação pelo organismo. No entanto, modificações na sequência de peptídeos podem ser efetuadas para eliminar algumas desvantagens como susceptibilidade a proteases e solubilidade (MASON, 2010).

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos, com as catelecidinas (ZANETTI, 2005), exercem importante papel na defesa contra infecções por eliminar uma grande variedade de patógenos (ZASLOFF, 2002; HANCOCK e SAHL, 2006). A LL-37 é oriunda da proteína hCAP-18 e a única catelecidina identificada em humanos (DURR *et al.*, 2006, sendo produzida por neutrófilos, monócitos, mastócitos e células epiteliais. Nessas células é armazenada na forma de pró-peptídeo, que pode ser clivado extracelularmente por enzimas como a proteinase 3, resultando na formação da LL-37 e uma parte de catelina. Tem sua liberação induzida frente à componentes bacterianos e IL-1 $\alpha$  (ERDAG e MORGAN, 2002). A LL-37 possui 37 aminoácidos, sendo liberado de forma ativa e forma poros na membrana bacteriana de micro-organismos (BUCKI e JANMEY, 2006). É um peptídeo anfipático em  $\alpha$ -hélice que possui atividade microbicida de amplo espectro, atingindo bactérias (Gram-positivas e negativas), fungos e vírus (DURR *et al.*, 2006; LÓPEZ-GARCIA *et al.*, 2005; BERGMAN *et al.*, 2007) e ainda, neutralizar LPS e ácido lipoteicóico (LTA) (SCOTT *et al.*, 2002). O mecanismo de ação da LL-37 pode envolver permeabilização de membrana ou inibição de crescimento microbiano, por exemplo, atua na parede celular e na membrana de *C. albicans* (LÓPEZ-GARCIA *et al.*, 2005). Estudo relatou a ligação de LL-37 a plasmídeos, levando-os ao núcleo celular (SANDGREN *et al.*, 2004). Ainda assim, outro estudo demonstrou redução em sua atividade na presença de soro e altas concentrações de sal (TRAVIS *et al.*, 2000). No entanto, sua atividade quimiotática não é afetada na presença de soro (YANG *et al.*, 2000).

Além de sua ampla ação bactericida, a LL-37 possui diversificada atividade de modular a resposta inflamatória e imunológica (HANCOCK e DIAMOND, 2000; NIJNIK *et al.*, 2009). Participa da interface entre as imunidades inata e adaptativa por modular a produção de citocinas e quimiocinas por uma ampla variedade de células e promover a quimioatração de células imunológicas (YANG *et al.*, 2000) e células-tronco mesenquimais (COFFELT *et al.*, 2009; BRAVO *et al.*, 2016). Outros estudos reportaram que a LL-37 aumenta a diferenciação de monócitos sanguíneos em iDCs direcionada por GM-CSF/IL-4 (DAVIDSON *et al.*, 2004), enquanto inibe a maturação de iDCs por TLR (KANDLER *et al.*, 2006). Além disso, esse peptídeo aumenta a resposta a monócitos e macrófagos a GM-CSF e IL-1 $\beta$  (YU *et al.*, 2007; BOWDISH *et al.*, 2004), porém suprime com IFN- $\gamma$  (NIJNIK *et al.*, 2009), indicando que a LL-37 afeta a resposta a fagócitos mononucleares às citocinas

diferentemente. Todos os efeitos da LL-37 sobre as células humanas pode ser mediado por receptores específicos de superfície celular (YANG *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2005; TJABRINGA *et al.*, 2003; ELSSNER *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2009) ou intracelulares (MOOKHERJEE *et al.*, 2009), porém, não se conhece o seu efeito na diferenciação de macrófagos.

Contudo, o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda não está totalmente elucidado, agravado pela ação pleiotrópica da LL-37, que pode se apresentar como um PAMs pró-inflamatório ou anti-inflamatório. Usualmente seus níveis de produção são aumentados em condições de infecção e inflamação (SCHALLER-BALS *et al.*, 2002; ONG *et al.*, 2002; SOEHNLEIN *et al.*, 2008). Estudos apontam que essa catelecidina está envolvida na quimiotaxia de monócitos, linfócitos T, neutrófilos e mastócitos (YANG *et al.*, 2000; NIYONSABA *et al.*, 2002), na indução ou supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (MOOKHERJEE *et al.*, 2006; NELL *et al.*, 2006; TJABRINGA *et al.*, 2003), indução do aumento da produção de quimiocinas e seus receptores (SCOTT *et al.*, 2002; BOWDISH *et al.*, 2005), promoção da angiogênese (KOCZULLA *et al.*, 2003) e reparo tecidual (VANDAMME *et al.*, 2012).

No estudo de DAVIDSON e colaboradores (2004) observou-se que o peptídeo catiônico LL-37 secretado no microambiente tecidual foi capaz de modificar a diferenciação de DCs, afetando todas as fases temporais de seu ciclo de amadurecimento. A catelecidina alterou, significativamente e seletivamente, o processo de endocitose e fagocitose, além do padrão de expressão de receptores fagocíticos em iDCs. Dessa forma, esses achados indicam o aumento da capacidade de apresentação antigênica e consequente, maior capacidade de ativação de linfócitos T (LANGENKAMP *et al.*, 2000). DCs diferenciadas quando na presença de LL-37 mostraram o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, de marcadores associados à apresentação de antígenos, de citocinas inflamatórias e de receptores de quimiocinas (FINDLAY *et al.*, 2019). A influência na diferenciação de DCs pode aumentar a sua produção de citocinas pró-Th1 em resposta a estímulos de maturação, prolongando e a deixando mais robusta contra antígenos patogênicos (DAVIDSON *et al.*, 2004). A LL-37 induz a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (TJABRINGA *et al.*, 2003), que atua na produção de IL-8, MCP-1 e MCP-3 por monócitos derivados de sangue periférico, na função de atrair neutrófilos, monócitos e macrófagos (BOWDISH *et al.*, 2005). Outro fator importante, o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), citocina produzida por macrófagos e linfócitos T, promove a sobrevivência, proliferação, diferenciação e ativação de células hematopoiéticas em

linhagens de macrófagos e neutrófilos, principalmente. Esta citocina tem a função de aprimorar os processos de apresentação de antígeno, fagocitose, morte por anticorpos, quimiotaxia e liberação de intermediários de oxigênio reativos e histaminas e, a sua presença diminui a quantidade necessária de LL-37 para induzir a ativação de MAPK (BOWDISH *et al.*, 2004).

O peptídeo LL-37 liga-se a receptores associados a proteína G (GPCRs), envolvidos no reconhecimento de patógenos e quimiocinas derivadas do hospedeiro (CHEN *et al.*, 2013; BREWER *et al.*, 2013), essenciais na migração de DCs (LUKACS-FORNEK *et al.*, 2008). Os receptores formilpeptídeo (FRPs), representantes da família dos GPCRs são importantes mediadores nas respostas imunológicas e inflamatórias (YE *et al.*, 2009; LE *et al.*, 2002), dos quais o FRP2, em humanos, reconhece a catelecidina LL-37 (TOMASINSIG e ZANETTI, 2005). Ademais, a sua atividade antimicrobiana e ligação ao LPS, a LL-37 possui ação quimioatrativa de leucócitos por meio da interação com o FPR2 (YANG *et al.*, 2000). Os receptores da imunidade inata, como os *toll-like* (TLRs) também reconhecem a catelecidina LL-37 (BROWN *et al.*, 2011).

Em camundongos, o ortólogo da LL-37, mCRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*) possui estrutura molecular semelhante e ambos são secretados a partir de grânulos neutrofílicos após uma lesão tecidual (GILLIET *et al.*, 2008; WAN *et al.*, 2007), porém possuem atividades diferentes na sinalização do TLR3 (SINGH *et al.*, 2013) e utiliza o receptor Fpr2 para indução de quimiotaxia e ativação leucocitária (KUROSAKA *et al.*, 2005). O receptor Fpr2 e CRAMP são importantes para a maturação normal de DCs e essenciais para o recrutamento dessas células nas repostas inflamatórias (CHEN *et al.*, 2014).

A LL-37 atua como molécula anti-inflamatória, protegendo camundongos e ratos após administração de uma dose letal de LPS por mostrar alta afinidade a essa molécula e neutralizar seu efeito biológico, reduzindo a produção de TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio (ZUGHAIER *et al.*, 2005). No entanto, também existem relatos que evidenciam o aumento na expressão de LL-37 por ação de IL-1 $\alpha$  e IL-6 (ERDAG e MORGAN, 2002) e a redução da produção de NO na presença deste (CIORNEI *et al.*, 2003a). Desta forma, suas propriedades imunomodulatórias influenciam células epiteliais e monócitos e pode agir sinergicamente com as citocinas produzidas em sítios inflamatórios (BOWDISH *et al.*, 2005). Além disso, ambos receptores FPR2 (humanos) e Fpr2 (murinos) reconhecem a porção N-terminal da anexina I (AnxA1) induzindo repostas anti-inflamatórias (CHIANG *et al.*, 2000; LEVY *et al.*, 2002).

Dado papel central das DCs nas respostas imunológicas, em especial na ativação de

linfócitos em resposta ao câncer (SAXENA *et al.*, 2018), estudos clínicos baseados no uso de DCs têm mostrado que a estratégia terapêutica com essas células são bem toleradas, promovendo a qualidade de vida do paciente (KANTOFF *et al.*, 2010; SCHREIBELT *et al.*, 2016), porém, ainda com insucessos de sua eficácia clínica, como a incapacidade das DCs em migrar efetivamente para os linfonodos após a transferência adotiva celular. Em um recente estudo foi demonstrado que DCs humanas e murinas geradas *ex vivo* e na presença da LL-37, aumentaram drasticamente a expressão e diferenciação em subpopulações de DCs CD103+/CD141+, incluindo a sua capacidade co-estimulatória e migratória resultando em respostas antitumorais mais robustas, e inclusive, a redução do tumor (FINDLAY *et al.*, 2019). Células dendríticas positivas para CD103+ (CD141+, em humanos) destacam-se pela habilidade de realizar apresentação antigênica cruzada, ativação de linfócitos T CD8+ e indução de imunidade antitumoral (ROBBINS *et al.*, 2008; BACHEM *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2014; CROZAT *et al.*, 2010; VILLADANGOS e SHORTMAN, 2010; JONGBLOED *et al.*, 2010; SATHE *et al.*, 2011; BROZ *et al.*, 2014). Nesse sentido, o conhecimento da influência da LL-37 em populações de DCs poderia servir de base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento do câncer.

## **JUSTIFICATIVA**

O grande interesse na compreensão do papel das vesículas extracelulares na comunicação célula-a-célula e envolvimento em diferentes processos biológicos tem atraído a atenção de pesquisadores, levando a publicação de inúmeros estudos sobre o tema. Apesar da sua diversidade funcional, o efeito imunomodulador em infecções e condições inflamatórias está no centro das atenções dos estudos com VEs, especialmente quando derivadas de células do sistema hematopoiético. Devido ao fato da importância das DCs nas respostas imunológicas inata e adaptativa, como também da reconhecida atividade imunomodulatória da LL-37, torna-se importante a avaliação da atividade funcional de vesículas extracelulares induzidas por esse peptídeo. Compreender as funções das VEs derivadas de DCs é essencial para revelar o seu potencial uso em aplicações terapêuticas, como por exemplo, em tumores.

## **OBJETIVOS**

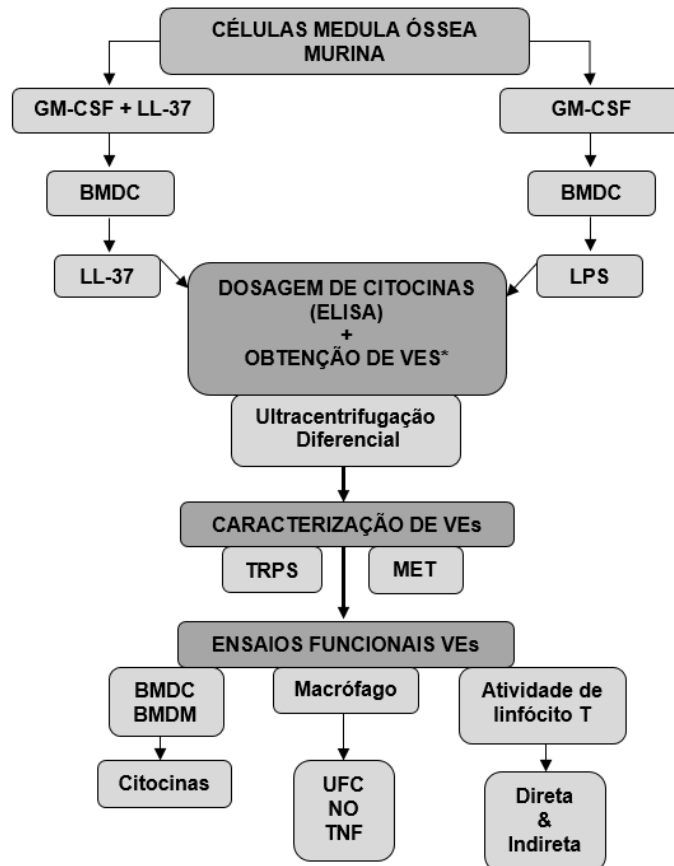
O principal objetivo do presente estudo foi caracterizar funcionalmente vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas murinas, induzidas pelo peptídeo LL-37. Para alcançar esse objetivo estabelecemos:

- ✓ Avaliar a atividade funcional do peptídeo LL-37 em células dendríticas, durante e após a sua diferenciação;
- ✓ Obter e caracterizar fisicamente as vesículas extracelulares quanto a morfologia, ao tamanho e a distribuição da população;
- ✓ Avaliar a atividade imunomodulatória de vesículas extracelulares, por meio da produção de citocinas, em DCs e macrófagos;
- ✓ Avaliar a interação funcional de VEs com linfócitos alogênicos e singênicos;
- ✓ Avaliar a atividade imunomodulatória de VEs em reação mista de leucócitos utilizando o modelo experimental de *P. brasiliensis*;
- ✓ Avaliar a atividade funcional de macrófagos infectados por *P. brasiliensis* e tratados com VEs, quanto a viabilidade fúngica, produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ .



## METODOLOGIA

### 1. Delineamento experimental



**Figura 6.** Proposta de delineamento experimental para análise funcional de vesículas extracelulares. \*VEs derivadas de BMDCs apenas com GM-CSF foram utilizadas como controle. GM-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Fator*); LL-37: peptídeo antimicrobiano LL-37; BMDC: células dendríticas derivadas da medula óssea (*Bone Marrow Dendritic Cell*); BMDM: macrófagos derivados da medula óssea (*Bone Marrow Derived Macrophage*); LPS: lipopolissacarídeo; ELISA: ensaio de imun absorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); VE: vesícula extracelular; TRPS: tecnologia por resistência de pulso (*Tunable Resistive Pulse Sensing*); MET: microscopia eletrônica de transmissão; UFC: Unidade Formadora de Colônias; NO: óxido nítrico; TNF: Fator de Necrose Tumoral.

### 2. Obtenção e preparo do peptídeo LL-37

O peptídeo LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) (AnaSpec Inc.®) utilizado neste projeto foi sintetizado em fase sólida a partir da metodologia F-moc-N-9-fluorenilmetiloxycarbonil41 purificados (>95%) por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC), conforme bula do fabricante.

Previamente à execução dos experimentos, foi realizada a confirmação da massa molecular e pureza deste por meio de espectrometria de massa MALDI-ToF Ultra Flex III (*Bruker Daltonics*, Billerica, MA) no laboratório de Peptídeos da Universidade Católica de Brasília (UCB), do Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia. Uma vez que o espectro de massa tenha demonstrado impurezas, com a presença de íons não compatíveis com o peptídeo ou íons compatíveis com degradação de amostra, o mesmo foi submetido à purificação por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RT-HPLC). Para tal, o peptídeo foi solubilizado em água ultrapura (500 µg) e submetido à coluna semipreparativa C18 (NST, 5 µm, 250 mm x 10 mm), sendo eluída com um gradiente linear de acetonitrila (5-95%) por 60 min, a um fluxo de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. As frações, monitoradas à 216 nm, foram coletadas e liofilizadas. Posteriormente à purificação, a amostra foi novamente analisada por MALDI-ToF. Para os experimentos, o peptídeo foi diluído em água ultrapura e sua quantificação confirmada por espectrometria utilizando absorção UV a 205, 215 e 225 nm, utilizando a fórmula de concentração proposta por MURPHY e KIES (1960), sendo  $A = (A_{215} - A_{225}) \times 0,144$ ;  $B = (A_{205}) \times 0,31$  e,  $(A + B)/2 = \text{mg. mL}^{-1}$ . Os peptídeos foram armazenados a -20 °C.

### **3. Obtenção de células dendríticas a partir de medula óssea de murinos**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6, com 8 semanas de idade, mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos na manipulação dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o UnBDoC no. 150057/2015.

As células dendríticas utilizadas foram obtidas por meio de diferenciação de células provenientes de medula óssea (*Bone Marrow Derived Dendritic Cells*, BMDCs) desses camundongos, conforme LUTZ *et al.*, 1999. Para tal, células de medula óssea foram coletadas do fêmur e tíbia dos animais, a partir da lavagem com meio RPMI 1640 simples não suplementado (*Roswell Park Memorial Institute; Sigma Chemical Co*) utilizando seringas de 1 mL. O meio contendo as células foi filtrado em *cell strainer* de 40 µm e centrifugado a 300 x g, por 5 minutos, para posterior lise dos eritrócitos com solução tampão de lise (0.16 M NH<sub>4</sub>Cl e 0.17 M Tris-HCl, pH 7.5). Após nova lavagem com meio RPMI-1640, o número total de células foi avaliado em câmara de *Neubauer* para ajustes de concentração. Um total de 2 x 10<sup>6</sup> células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI-

1640 completo de diferenciação, contendo HEPES (25 mM), gentamicina (50 mg/L), bicarbonato de sódio (2 g/L), 10% de SFB (soro fetal bovino, Invitrogen),  $\beta$ -mercaptoetanol (20 ng/mL) e fator de diferenciação e sobrevivência de monócitos e granulócitos (GM-CSF, 20 ng/mL) (*Imunotools*), em placas de Petri plásticas e cultivadas por 8 dias, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No terceiro dia de cultivo foram adicionados 10 mL do meio RPMI-1640 completo, em cada placa de cultivo, como descrito acima. No sexto dia da diferenciação, um total de 10 mL de suspensão de células de cada placa foi transferido para um tubo plástico de 50 mL e centrifugado a 300 x g, por 5 minutos, para que o precipitado celular fosse ressuspenso em meio RPMI-1640 completo de diferenciação fresco e recolocado na placa de cultura original. Para avaliação da atividade do peptídeo LL-37 na diferenciação de DCs, as células da medula foram cultivadas no meio diferenciação, como indicado acima, na presença de 10 ou 25  $\mu$ g/mL de LL-37, durante os 8 dias de cultivo e sem renovação do peptídeo.

No oitavo dia, células não aderentes ou fracamente aderidas (BMDCs) foram coletadas do sobrenadante por sucessivas lavagens com RPMI simples e os macrófagos (*Bone Marrow Derived Macrophage*, BMDMs) aderentes foram, então, coletados após serem removidos das placas utilizando TrypLE™ (Gibco). A fenotipagem dos fagócitos obtidos é avaliada regularmente no Laboratório de Imunologia Aplicada – IB (UnB) utilizando citometria de fluxo, verificando-se consistentemente que as BMDCs e os BMDMs cultivados em GM-CSF são em média 75-85% positivos para CD11c e MHC II, e 85-90% positivos para CD11b e F4/80, respectivamente (dados não mostrados). Adicionalmente, a análise da maturação das BMDCs é realizada pela avaliação do nível de expressão de MHC II, resultando em baixos níveis dessa molécula (MHC-II<sup>LOW</sup>) sugerindo fortemente que as BMDCs obtidas estão em estado imaturo, corroborando os dados de LUTZ *et al.*, 1999 que indicam esse perfil de maturação quando a diferenciação, a partir das células de medula óssea, é mantida por oito dias.

#### **4. Tratamento de BMDCs com LL-37 para avaliação funcional (produção de citocinas) e purificação de VEs**

As BMDCs obtidas da diferenciação celular na presença ou ausência de LL-37 foram ressuspenso em meio RPMI 1640 suplementado com 50 mg/mL de gentamicina, 200 mM de L-glutamina, bicarbonato de sódio (2 g/L) e 10% de SFB depletado de vesículas por meio de ultracentrifugação. BMDCs foram então ajustadas à concentração de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL

(volume total de 40 mL) em frascos de cultura de células, com 175 cm<sup>2</sup> de área, e tratadas nas seguintes condições: 10 µg/mL ou 25 µg/mL de LL-37; 500 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS de *E. coli* O111:B4, *Invivogen*); ou ainda mantidas sem tratamento, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados em tubos plásticos estéreis de 50 mL em freezer a -80°C para a posterior purificação de vesículas extracelulares, por ultracentrifugação diferencial e quantificação de citocinas (TNF-α, IL-12p70, IL-6, IL-1β, IL-10 e CCL2) por ensaio imunoenzimáticos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de captura, utilizando os kits *Ready-Set-Go!* ELISA (*Affymetrix/eBioscience*), seguindo-se as especificações do fabricante. Resumidamente, placas de poliestireno de alta afinidade de 96 poços foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura durante a noite, à temperatura de 4°C. Após 3 lavagens das placas com PBS contendo 0,05% de *Tween 20*, foi realizado um bloqueio de sítios de ligação inespecífica com as soluções proteicas por 1 hora, à temperatura ambiente. Após novas lavagens, os sobrenadantes de cultura foram adicionados e, paralelamente, curvas padrão das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas, em diluições duplas seriadas, para análise das concentrações. As placas foram então deixadas à temperatura de 4°C durante a noite e, no terceiro dia, foram novamente lavadas 3 vezes. As placas foram incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 1 hora, à temperatura ambiente e, após novas lavagens, adicionou-se o conjugado estreptavidina-peroxidase. Após 30 minutos de incubação com a enzima, à temperatura ambiente e abrigadas da luz, as placas foram novamente lavadas. Ao final do último ciclo de lavagens, adicionou-se às placas o substrato enzimático TMB (tetrametilbenzidina) para a revelação da reação. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2 N e a densidade óptica (DO) determinada em espectrofotômetro (450 nm de comprimento de onda) e as concentrações das amostras determinadas de acordo com a DO da curva padrão, utilizando o software Pro-Max 5.2.

## **5. Purificação de vesículas extracelulares e caracterização física**

As vesículas extracelulares secretadas por BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e posteriormente tratadas com o peptídeo ou somente estimuladas por LPS serão denominadas no decorrer do texto como VE-LL-37 e VE-LPS, respectivamente. Para a purificação e obtenção das VEs a partir dos sobrenadantes da cultura de células foi utilizado o método de ultracentrifugação diferencial descrito por LOBB *et al.*, 2015. Os sobrenadantes das culturas celulares foram centrifugados a 300 x g a 4°C por 10 min, utilizando a centrífuga

*Beckman Coulter Allegra X-15R* para remover resquícios celulares e sedimentar as células. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e filtrado em poro 0,22  $\mu\text{m}$  (KASVI, Brasil) para remover corpos apoptóticos contaminantes e debris celulares e após, o sedimento foi descartado. Procedeu-se a ultracentrifugação em Ultracentrífuga *Beckman Coulter Optima TM XE-90* a 100.000 x g a 4°C por 90 minutos, utilizando-se rotor SE41Ti, tubos 331372 para sedimentar as vesículas. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e o *pellet* eluído em 1 mL de tampão PBS 1X filtrado e gelado. A etapa de ultracentrifugação foi repetida afim de concentrar as VEs. O novo *pellet* formado foi eluído em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS 1x filtrado e gelado e armazenado a -80°C, se não fosse imediatamente utilizado.

### **5.1. Tunable Resistive Pulse Sensing (tRPS)**

A concentração e distribuição do tamanho das vesículas extracelulares foi avaliada por tecnologia de resistência de pulso (tRPS) utilizando-se o instrumento qNano (*Izon Science Ltd., Christchurch, New Zealand*), conforme descrito por MAAS *et al.*, 2014. O instrumento foi calibrado utilizando microesferas (*beads*) de poliestireno CPC100 e CPC200 (*Izon Science*) conforme instruções fornecidas pelo fabricante. As amostras foram eluídas 3x em PBS. As VEs foram medidas utilizando o nanoporo NP150 (limite da análise entre 60 a 480 nm; *Izon Science*) e com 7,5 mbar de pressão. As condições analíticas de voltagem (tensão= 0,80V) e abertura de poro (46 nm) foram padronizadas para manter a corrente elétrica com a variação entre 140 e 160 nA. As amostras foram analisadas por 5 minutos ou até a contagem próxima de 1.000 vesículas. Os dados foram obtidos e analisados usando o software *Izon Control Suite* versão 3.0.

Previamente a cada análise, as soluções de PBS 1x filtrado e os calibradores de microesferas CPC100 e CPC200 foram utilizadas como controles para avaliar o fluxo de partículas e posteriormente, calibrar cada análise a ser realizada. Em caso de mudança perceptível dos parâmetros analíticos e do fluxo de partículas, o poro foi submetido a lavagens adicionais ou a alteração temporária de sua abertura, a tampa de proteção da célula de fluido foi reencaixada e a pressão aumentada aplicando o êmbolo no equipamento.

### **5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para a análise das amostras utilizou-se telas (*grids*) de níquel de 200 *mesh*

previamente limpos por lavagens sucessiva em solução de HCl 0,1 M, etanol 95% e acetona 100%. Em seguida, as telas foram revestidas com resina plástica formvar 0,8% diluído em clorofórmio 100% (LÄSSER *et al.*, 2012). As amostras foram fixadas adicionando-se o fixador Karnovsky 0,1 M na proporção 1:1 de volume. A contrastação foi realizada utilizando-se os contrastantes à base de metais pesados ácido fosfotungstístico (PTA) a 2% e acetato de uranila, sendo adicionados sob 3 µL de cada uma das amostras. O contrastante PTA 2% e acetato de uranila foram deixados em contato com as amostras por 2 minutos e 1 minuto e meio respectivamente, e o seu excesso foi removido com o auxílio de um papel absorvente. A mesma amostra foi contrastada utilizando-se ambos os contrastantes. As imagens foram adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1011 (JEOL, Peabody, MA, EUA), do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

## **6. Tratamento de BMDCs com VEs derivadas de BMDCs tratadas com LL-37**

BMDCs foram adicionadas a placas de cultura de células de 24 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  em meio RPMI suplementado (como descrito acima) em volume final de 500 µl/poço. Foram então adicionados 25 ou 50 µL da solução contendo as vesículas derivadas do tratamento de BMDCs com 25 µg/mL de LL37 (VE-LL-37) (razão vesícula:célula igual a  $2,06 \times 10^7$  e  $4,12 \times 10^7$ , respectivamente). Adicionalmente, 50 µL da solução com vesículas derivadas do tratamento de BMDCs com 500 ng/mL de LPS (VE-LPS) (razão vesícula:célula igual a  $1 \times 10^4$ ) foram utilizadas. O cultivo foi então mantido a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas, quando o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA.

## **7. Avaliação das vesículas derivadas de BMDCs (VE-LL-37 e VE-LPS) com linfócitos T alogênicos e singênicos e na reação mista de leucócitos**

Esplenócitos totais foram obtidos a partir do divulsionamento do baço de camundongos adultos sadios BALB/c (alogênicos) ou C57BL/6 (singênicos) utilizando pinças dente-de-rato em meio RPMI 1640 simples. Após a retirada de restos teciduais e lise de hemácias utilizando tampão amônio-clorídrico (1 mL/baço), os esplenócitos foram quantificados e adicionados a placas de Petri, por 2 horas, em meio RPMI simples (37°C e

5% de CO<sub>2</sub>) para obtenção preferencial de linfócitos T que não aderem fortemente a placa como os monócitos, macrófagos e linfócitos B esplênicos. Os linfócitos T totais foram então coletados do sobrenadante e quantificados para o uso nos experimentos de interação direta com as VEs ou ainda na cultura mista de leucócitos, em meio RPMI 1640 suplementado para proliferação de linfócitos T (1% de aminoácidos não essenciais; 1% de piruvato de sódio 100 mM; 10% de SFB depletado de VEs; 2 mM de L-glutamina; 50 µM de 2β-mercaptoetanol; 50 mg/L de gentamicina), conforme descrito a seguir.

### **7.1. Avaliação da interação direta das vesículas extracelulares com linfócitos T alogênicos ou singênicos**

As vesículas derivadas de BMDCs (VE-LL37 ou VE-LPS) foram adicionadas a 2 x 10<sup>5</sup> linfócitos T totais alogênicos ou singênicos, por poço (na razão VE-LL37: célula de 2,06 x 10<sup>7</sup> e para VE-LPS de 1 x 10<sup>4</sup>), em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado para linfócitos T, como descrito acima. Após 5 dias de cultivo, o sobrenadante foi coletado e avaliado quanto a produção das citocinas IFN-γ, IL-13 e IL-17, utilizando ELISA, como descrito acima.

### **7.2. Avaliação funcional das VEs na reação mista de leucócitos utilizando o modelo de infecção *in vitro* de BMDCs por leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis***

#### **7.2.1. Cultivo do fungo *P. brasiliensis* e preparação do inóculo para infecção *in vitro* BMDCs**

O isolado virulento 18 (Pb18) de *P. brasiliensis* foi cultivado em meio semi-sólido BHI (*Brain Heart Infusion*)-ágar com gentamicina (100 µg/mL) e suplementado com 5% SFB e 5% de solução de glicose a 30%, por 7 dias a 37°C. Para a infecção das células as leveduras foram transferidas para um tubo de 15 mL contendo pérolas de vidro em meio RPMI 1640 simples (5ml) e submetidas ao agitador *vortex* três vezes, por 10 segundos. Após 5 minutos de repouso, 1 mL da suspensão foi transferido para tubos de 1 mL e passado sucessivamente com auxílio de seringa através de agulha (U-100) para se desfazer de possíveis “grumos” formados pelo fungo. As leveduras foram quantificadas em câmara de *Neubauer* para ajustes de concentração e preparação do inóculo em RPMI 1640.

#### **7.2.2. Reação mista de leucócitos**

Para avaliação funcional das VEs na reação mista de leucócitos,  $2,5 \times 10^5$  BMDCs tratadas previamente ou não com VE-LL-37, por 24 horas, na razão VE-LL-37:célula de  $2,06 \times 10^7$ , foram infectadas com leveduras de *P. brasiliensis* (razão BMDCs:levedura de 2:1) por 6 horas (placas de cultura de 24 orifícios). Após retirada dos fungos extracelulares por meio de lavagens sucessivas, foram adicionados ao cultivo os linfócitos T singênicos. A proporção final foi de 1:10 (BMDCs:linfócitos T) e as co-culturas foram então mantidas em meio RPMI suplementado para linfócitos T por 5 dias ( $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ), quando foram coletados os sobrenadantes para quantificação de citocinas, IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-17 por ELISA.

## **8. Avaliação funcional das vesículas derivadas de BMDCs (VE-LL37) na capacidade fungicida, produção de citocinas e óxido nítrico de macrófagos infectados por *P. brasiliensis***

### **8.1. Infecção de BMDMs com *P. brasiliensis*, tratamento com VE-LL-37 e determinação da carga fúngica**

BMDMs ( $2,5 \times 10^5$ /poço) foram infectadas por *P. brasilienses* na proporção 2 macrófago:1 fungo em placas de 24 poços, em um volume de 500  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 com 10% de SFB e cultivadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  contendo VE-LL-37 na razão (VE:fagócito de  $2,06 \times 10^7$ ). Após 48 horas de co-cultivo, o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ) e os BMDMs lisados, com solução aquosa de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS a 0,05%). A suspensão obtida foi então diluída (1:10) em meio RPMI 1640 e plaqueada em meio BHI-ágar suplementado com 5% de SFB depletado de VEs e 5% de glicose a 30% para incubação em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por até 10 dias para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Como controle positivo para aumentada capacidade fungicida de macrófagos e produção de  $\text{NO}^-$ , as células foram tratadas com 500 ng/mL de LPS e 100 U/mL de IFN- $\gamma$ .

### **8.2. Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante das co-culturas de fagócitos**

A dosagem indireta de  $\text{NO}^-$  foi feita no sobrenadante de BMDMs infectados e tratados com VE-LL-37 ou não, utilizando a reação colorimétrica de *Griess*, baseado em GREEN *et al.* (1981). Brevemente, as estimativas dos níveis de  $\text{NO}$  foram obtidas a partir do consumo de elétrons de  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{NO}_2^-$  pela adição de sulfanilamida ao sobrenadante,



formando o composto diazônico ( $\text{NO}_2^-$ ). Este reage com bicloridrato-N-(1-naftil)-etilenodiamina para formar um composto de coloração rósea, cuja densidade ótica (DO) será avaliado por meio de espectrofotometria (550 nm). A concentração de nitrito foi determinada em referência a uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

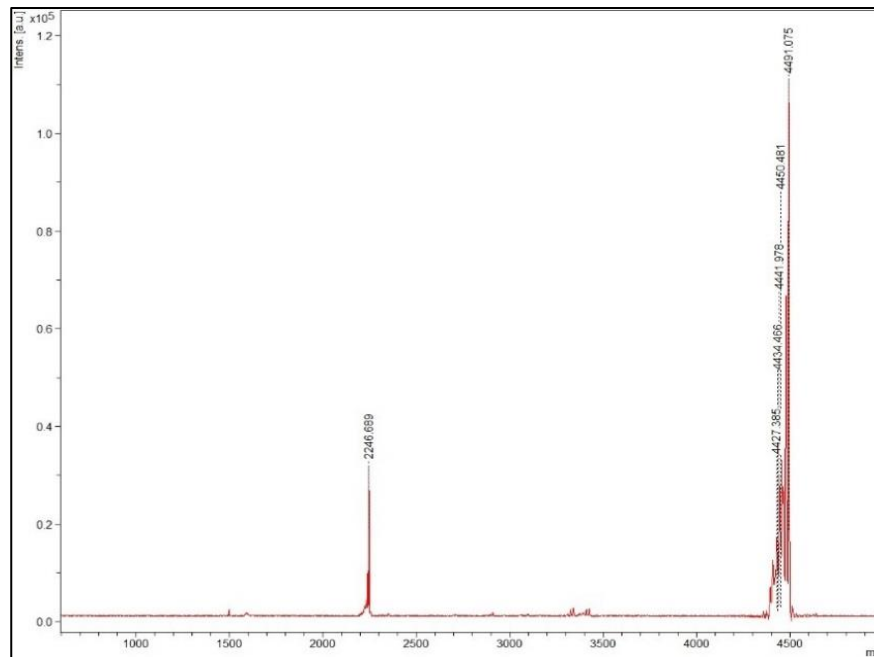
## **9. Análise estatística**

Foi utilizada análise da variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre os grupos experimentais, seguida pelo método pós-teste (Bonferroni *t test*). Testes e análises foram feitos pelo programa *GraphPad Prisma* versão 6.0 para *Windows* (San Diego, Califórnia, USA). Dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Análise do grau de pureza e quantificação do peptídeo LL-37

A catelecidina LL-37 foi analisada quanto a sua pureza e massa molecular utilizando MALDI-ToF, de acordo com a sequência LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-NH<sub>2</sub> e massa molecular de 4493,33 Da. Adicionalmente foi realizada a purificação do material por meio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e sua concentração confirmada por espectrofotometria. O espectro de massa foi usado como referência para posteriores análises de outros lotes do mesmo peptídeo (Figura 7).

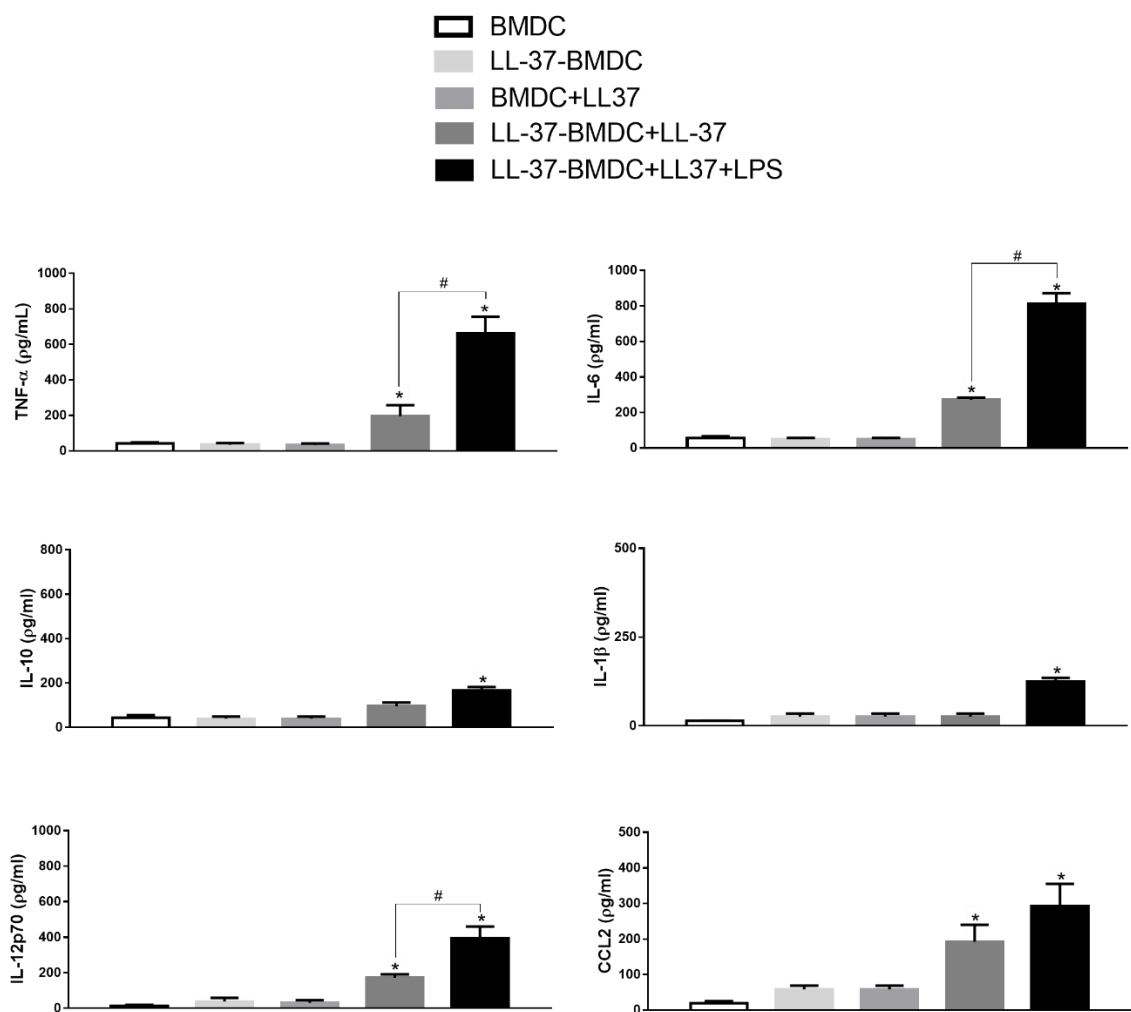


**Figura 7.** Espectro obtido por MALDI-ToF referente ao peptídeo LL-37 (4493.33 Da), com dupla carga (2248.68 Da), com pureza > 90%. Aquisição Anaspec, CA.

### 2. BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo produz citocinas pró-inflamatórias

As DCs, derivadas da medula óssea murina ou de monócitos humanos expostas ao peptídeo LL-37 ou seu homólogo CRAMP durante seu processo de diferenciação sofrem alterações evidenciadas, por exemplo, pelo aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e secreção de citocinas relacionadas ao desenvolvimento de respostas Th1 (DAVIDSON *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2014; FINDLAY *et al.*, 2019). Nesse contexto, no

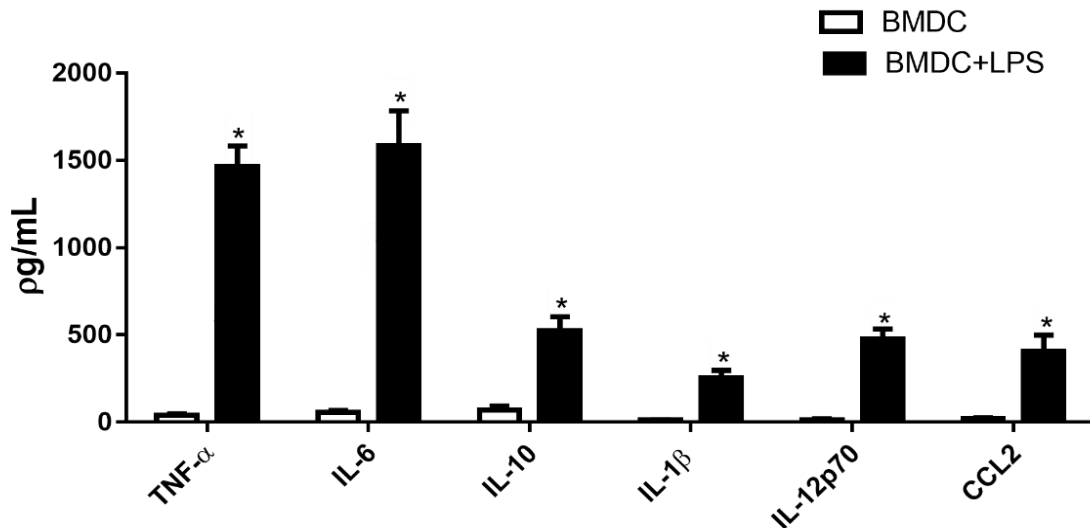
intuito da confirmação da atividade funcional de LL-37, por meio da quantificação de citocinas secretadas, as BMDCs foram coletadas do sobrenadante da cultura no oitavo dia de diferenciação induzida por GM-CSF na ausência ou presença de 25 µg/mL de LL-37. As células foram então lavadas e cultivadas por 24 horas adicionais em meio de cultura fresco contendo LL-37. Avaliamos ainda a secreção das citocinas induzidas por estímulo com LPS (100 ng/mL) por mais 12 horas. Os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e quimiocina CCL2 foram analisados por ELISA (Figura 8).



**Figura 8. Tratamento com LL-37 induz produção de citocinas e CCL2 em BMDCs diferenciadas na presença desse peptídeo com ou sem estímulo por LPS.** Os sobrenadantes das culturas foram coletados para quantificação por ELISA das citocinas e quimiocina secretadas nas diferentes condições, **BMDCs**: DCs diferenciadas na ausência de LL-37; **LL-37-BMDCs**: DCs diferenciadas na presença de LL-37; **BMDCs+LL37**: DCs diferenciadas na ausência de LL-37 e tratadas com esse peptídeo; **LL-37-BMDCs+LL-37**: DCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo; **LL-37-BMDCs+LL-37+LPS**: DCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo seguido de LPS. LL-37 (25 µg/mL/24h) e LPS (100 ng/mL/12h). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo BMDCs. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

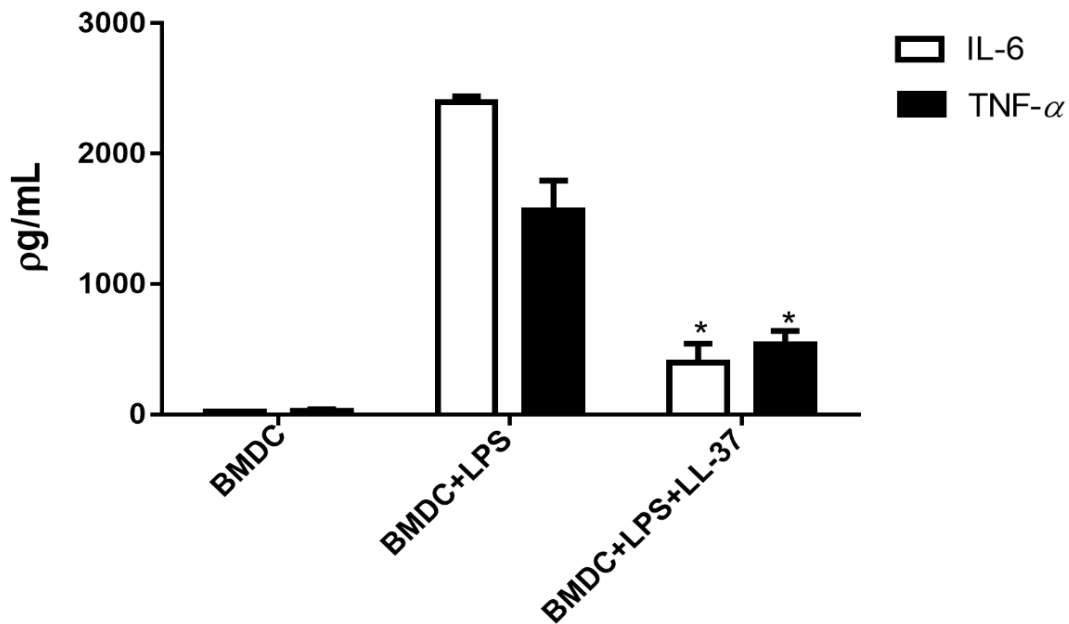
A produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e CCL2 de forma espontânea (ou seja, sem adição de LPS) foi significativa nas BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (LL-37-BMDCs+LL-37) e não nos fagócitos diferenciados na presença de LL-37 ou apenas tratados com esse peptídeo (LL-37-BMDCs e BMDCs+LL-37, respectivamente) quando comparados ao grupo controle BMDCs (Figura 8). A adição de LPS ao grupo LL-37-BMDCs-LL-37 aumentou significativamente a produção dessas citocinas. Além disso, IL-10 e IL-1 $\beta$  foram secretadas de forma significativa apenas no grupo tratado com LPS, sugerindo que a indução dessas citocinas era somente dependente dessa molécula. Importante notar que não houve produção espontânea de citocinas nos grupos tratados com 10  $\mu$ g/mL de LL-37 durante e/ou pós-diferenciação. Somente quando LPS foi adicionado obteve-se produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e CCL2 (dados não mostrados).

Adicionalmente, BMDCs diferenciadas na ausência de LL-37 e tratadas com LPS (500 ng/mL) por 24 horas também foram avaliadas quanto a produção de citocinas e para obtenção de VEs derivadas de DCs maduras com um perfil imunomodulador conhecido (SEGURA *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2010; BUCIO-LÓPEZ *et al.*, 2018; SCHIERER *et al.*, 2018). Como esperado, todas citocinas foram significativamente mais expressas quando comparado as células não tratadas (Figura 9). Assim, considerando esses resultados selecionamos o sobrenadante das culturas dos grupos experimentais LL-37-BMDCs+LL-37 (10 e 25  $\mu$ g/ml) e BMDCs+LPS para purificação de suas VEs e caracterização conforme indicado na seção 3 dos Resultados). As VEs derivadas dos grupos acima foram denominadas de VE-LL-37 e VE-LPS, respectivamente.



**Figura 9. BMDCs tratadas com LPS produzem citocinas e CCL2.** BMDCs foram obtidas e tratadas por 24 horas com 500 ng/mL de LPS. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo BMDCs. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

Interessantemente, LL-37 pode promover ações anti-inflamatórias ao, por exemplo, modular negativamente a função de TLR4 pois se associa ao seu ligante LPS. Isso resulta em níveis reduzidos na produção de citocinas pró-inflamatórias por fagócitos, quando LL-37 e LPS estão presentes concomitantemente (LARRICK *et al.*, 1995; ROSENFELD *et al.*, 2006; KANDLER *et al.*, 2006). De fato, observamos que secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzidas por 1  $\mu$ g/mL de LPS foram significativamente inibidas ao cultivarmos BMDCs com LPS e LL-37 (25  $\mu$ g/mL) simultaneamente (Figura 10). Coletivamente, esses resultados sugerem atividade funcional preservada da LL-37 utilizada no presente trabalho, tanto na sua descrita função pró- ou anti-inflamatória.



**Figura 10. Tratamento concomitante de BMDCs com LPS e LL-37 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias.** BMDCs foram tratadas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) ou LPS e LL-37 (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 horas o sobrenadante foi coletado e avaliado quanto a produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  por ELISA. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo BMDCs+LPS. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

### 3. Análise da distribuição da população de vesículas extracelulares por tecnologia de resistência de pulso (tRPS)

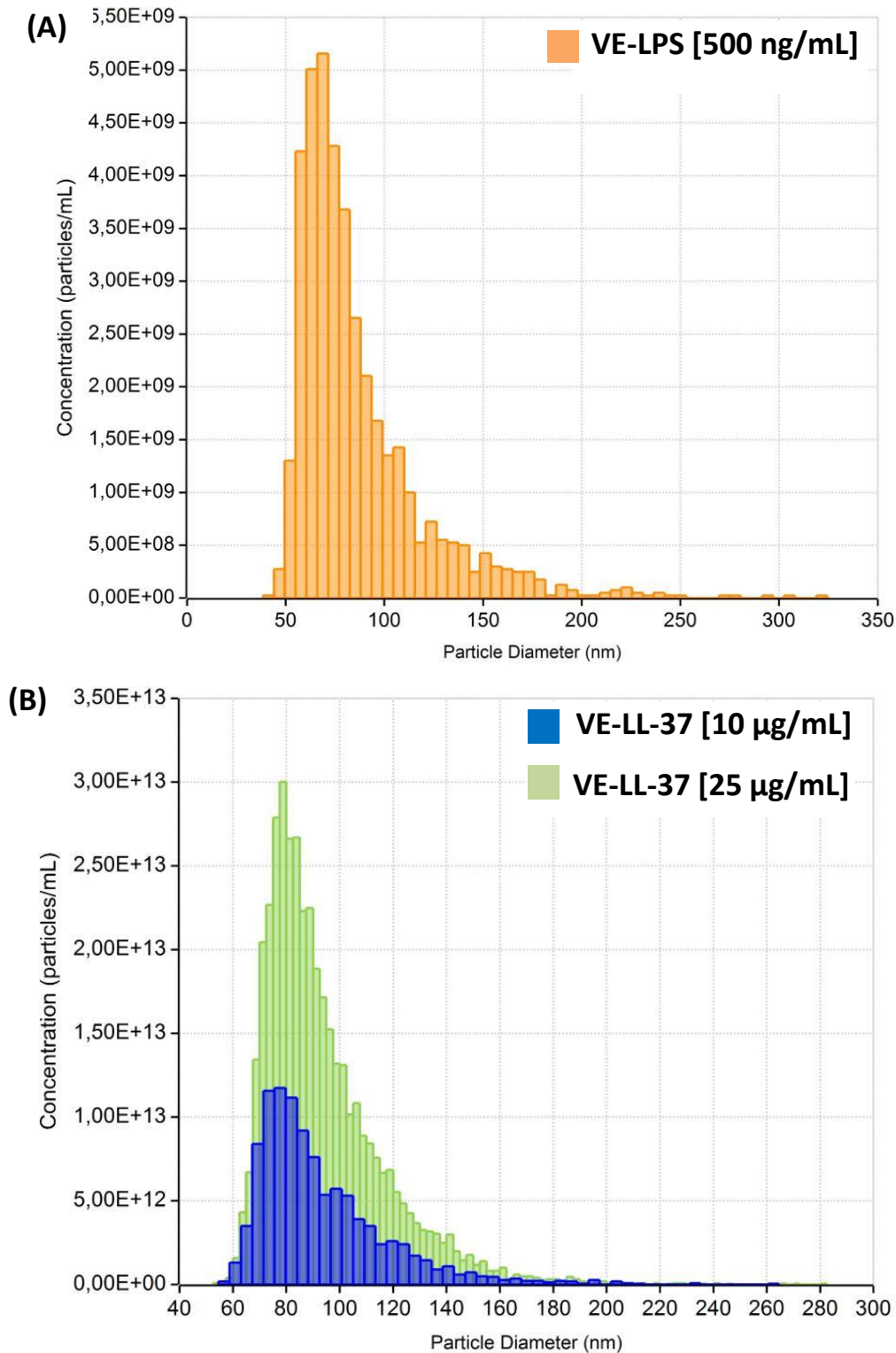
Após obtenção das VE-LL-37 e VE-LPS por ultracentrifugação como descrito no Material e Métodos, prosseguimos com sua caracterização morfológica. O qNano é o único equipamento comercial que emprega a plataforma tRPS. Nessa tecnologia, duas células de fluido são separadas por uma membrana elástica não condutora que possui um poro de tamanho nanométrico. Uma das células é preenchida com a amostra de interesse, enquanto a outra contém eletrólito sem partículas (PBS, por exemplo). Ao aplicar uma voltagem, é estabelecida uma corrente elétrica (fluxo iônico) que é alterada quando a partícula atravessa o poro. A magnitude desse bloqueio (pulso resistivo) é proporcional ao volume da partícula e a sua duração (VOGEL *et al.*, 2011; KOZAK *et al.*, 2012) pode ser utilizada para avaliar o potencial zeta dessas nanopartículas, baseada na sua carga ou forma. Além disso, o número de ocorrências desse evento pode ser mensurado e dependerá da concentração de partículas na amostra. Como esses parâmetros são linearmente proporcionais (WILLMOTT *et al.*, 2010), o uso de calibradores (fornecidos pelo fabricante) com partículas de tamanho e concentração conhecidas (ROBERTS *et al.*, 2012), permite a avaliação de do tamanho e distribuição (VOGEL *et al.*, 2011) das partículas em amostras de conteúdo desconhecido.

Sabendo que a quantificação baseada na tecnologia de resistência de pulso (tRPS) requer a correlação linear entre a taxa de contagem de partícula (partículas/minuto) e a concentração de partículas, o primeiro dado obtido foi do calibrador específico para o poro NP150 (análise da faixa de leitura: 60 a 480 nm; concentração:  $5 \times 10^9$ /mL; calibração de partículas: CPC100, 200; conforme indicação do fabricante). Observou-se linearidade com  $R^2=0,973$ , dados não apresentados.

A análise por tRPS indicou que o diâmetro da maioria das VE-LL37 produzidas por DCs obtidas na presença de LL-37 durante a sua diferenciação e posteriormente tratadas com esse peptídeo (LL-37-BMDCs+LL-37), nas concentrações de 10 e 25  $\mu$ g/mL, e de VE-LPS derivadas de BMDCs tratadas somente com LPS (BMDCs-LPS), na concentração de 500 ng/mL, foi menor do que 100 nm (Figura 11). Entretanto, observamos o aumento na concentração de VE-LL37 e de partículas de menor diâmetro, quando comparadas a VE-LPS. Além disso, notamos que o peptídeo na concentração de 25  $\mu$ g/mL estava relacionado a um aumento da população de VEs, indicando que a LL-37 pode ser um estímulo para o incremento da produção de VEs (Figura 11B). TUCHER e colaboradores (2018) mostrou que estímulos distintos resultam na liberação de VEs de diferentes tamanhos e distribuição de suas populações ao comparar vesículas derivadas de linfócitos ativados e em apoptose.

A amostra de VE-LPS apresentou partículas com diâmetro médio de  $87 \pm 33,6$  nm, moda de  $69 \pm 2,8$  nm e concentração média de  $3,91 \times 10^{10}$  partículas/mL. A amostra contendo VE-LL-37 derivadas de BMDCs tratadas na concentração de 10  $\mu$ g/mL apresentou partículas com  $93 \pm 24,4$  nm de diâmetro médio, moda=  $78 \pm 2,1$  nm e concentração média=  $1,06 \times 10^{14}$  partículas/mL; enquanto na concentração de 25  $\mu$ g/mL, as partículas apresentaram o diâmetro médio=  $94 \pm 22,9$ , moda=  $79 \pm 2,1$  nm e concentração média=  $4,12 \times 10^{14}$  partículas/mL. Observamos dessa forma, que após a centrifugação a 100.000 g a distribuição das partículas predominou no diâmetro abaixo de 200 nm, corroborado por KOWAL *et al.*, 2016. Não foram observadas VEs no sobrenadante obtido da cultura celular de dendríticas não-tratadas (dados não apresentados).

Na fase preliminar do estudo, tentou-se utilizar um nanoporo menor (NP100), indicado para a detecção de partículas menores do que aquelas detectadas no poro NP150. Contudo, a aplicação de amostras a partir de sobrenadantes de cultura celular resultou em imediata saturação (entupimento) da abertura do poro, como por exemplo, a obstrução causada por movimento de íons ou outras partículas, assim, bloqueando parcialmente ou totalmente a passagem de partículas, tornando as análises com uso desse nanoporo inviável.



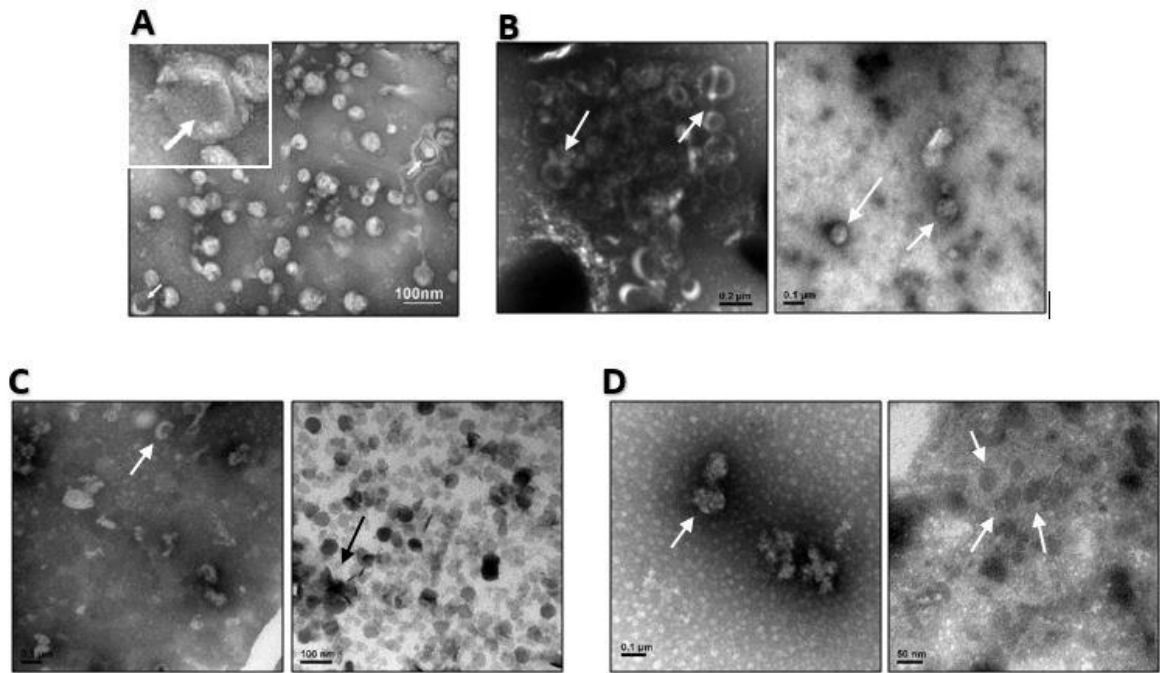
**Figura 11.** Distribuição por tamanho de VEs produzidas por células dendríticas murinas, em (A) tem-se VE-LPS e em (B) VE-LL-37, com o peptídeo em diferentes concentrações. **(A)** VE-LPS tratadas com 500 ng/mL de LPS. Condições de corrida = no. partículas contadas: 1.587 (158,6 partículas/min.); tempo de corrida: 600,3 s; corrente média: 82,81 nA; ruído RMS médio: 11,57 pA; abertura do poro: 45 µm; voltagem: 0,80 V. **(B)** VE-LL-37 tratadas com 10 µg/mL (azul) e 25 µg/mL (verde) de LL-37. Condições de corrida [25 µg/mL] = no. partículas contadas: 9.095 (909,4 partículas/min); tempo de corrida: 600 s; corrente média: 64,25 nA; ruído RMS médio: 7,73 pA; abertura do poro: 45 µm; voltagem: 0,28 V. Condições de corrida [10 µg/mL] = no. partículas contadas: 2.330 (232,9 partículas/min); tempo de corrida: 600,1 s; corrente média: 68,61 nA; ruído RMS médio: 7,57 pA; abertura do poro: 45 µm; voltagem: 0,28 V.



#### **4. Análise morfológica das vesículas extracelulares por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Em estado natural as VEs apresentam morfologia esférica e por isso o seu tamanho é fornecido em diâmetro e sua avaliação pode ser realizada por meio de técnicas que possuam resolução em nanômetros, a exemplo da microscopia eletrônica de transmissão. Os exossomos apresentam-se em forma de taça (*cup-shaped*) após a fixação, adesão, contrastação e visualização no MET e pode ser utilizada na distinção de outras vesículas, presente em uma mesma amostra e com tamanhos similares (MARZESCO *et al.*, 2005). Em nosso estudo, ao utilizar o MET para a caracterização morfológica das VEs optou-se pela contrastação com PTA e acetato de uranila afim de avaliar a que permitiria gerar o melhor resultado, não sendo observada diferenças importantes entre ambas. Embora a morfologia esférica das VEs não tenha sido observada e, sabendo que a técnica de MET por ser realizada à vácuo, a fixação e desidratação na preparação prévia da amostra, muito frequentemente afeta o tamanho e morfologia das vesículas (VAN DER POL *et al.*, 2010), além da consideração de que a ultracentrifugação com acelerações entre 100.000 e 200.000g podem ocasionar a fusão de vesículas e contaminação do precipitado, dificultando a análise por meio de MET (GYÖRGY *et al.*, 2011), as amostras indicam a presença de VEs.

Observou-se que a morfologia das VEs se manteve mesmo após terem sido submetidas a duas ultracentrifugações a 100.000 g (Figura 12), principalmente na forma “*cup-shaped*” e tamanho variando entre 50 a 130 nm. As VE-LL-37 apresentaram formando pequenos agregados (Figura 12D, imagem à esquerda). Os resultados preliminares apontam a necessidade de avaliar a metodologia de ultracentrifugação de modo que haja uma diminuição da formação de agregados de vesículas, como também, da relevância de confirmar se as partículas encontradas nas amostras são efetivamente VEs ou outras vesículas. O uso da técnica do MET aliado ao uso de imunomarcadores poderá ser importante para solucionar esta questão. A contrastação utilizando-se tetróxido de ósmio em diferentes tempos não gerou resultados satisfatórios, razão pela qual optou-se pelo uso do PTA 2% e acetato de uranila, contudo, os resultados prévios denotam a necessidade de repetição do experimento a fim de se obter novas e melhores eletromicrografias.



**Figura 12.** Morfologia das vesículas extracelulares presentes nas amostras de sobrenadante de cultura celular de células dendríticas analisadas na microscopia eletrônica de transmissão. (A) Eletromicrografia de exossomos derivados de BMDCs purificados de sobrenadante publicado por MONTECALVO *et al.*, 2013. Nota-se a característica “cup-shaped” destacada no aumento. Escala: 100 nm; (B) VE-LPS [500 ng/mL], a esquerda com contrastante PTA 2% e à direita, acetato de uranila; (C) VE-LL-37 [25 µl/mL], a esquerda com contrastante PTA 2% e à direita, acetato de uranila; (D) VE-LL-37 [10 µl/mL], a esquerda com contrastante PTA 2% e à direita, acetato de uranila. As setas indicam vesículas com morfologia e tamanho compatíveis com EVs. Escala = 100 nm.

## 5. Tratamento de BMDCs e BMDMs com VEs derivadas de LL-37-BMDCs tratadas com LL-37 (VE-LL-37) ativa secreção de citocinas pró-inflamatórias e CCL2

Estudos demonstram a modulação da secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por VEs de DCs, macrófagos, mastócitos e linfócitos T e B em células alvo de origem hematopoiética ou não (SKOKOS *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2017). Nesse contexto, para caracterizar as consequências funcionais das VEs derivadas de DCs (VE-LL-37 ou VE-LPS), inicialmente avaliamos o perfil de citocinas induzidas por essas vesículas em BMDCs e macrófagos (BMDMs) sem estímulo prévio. Considerando a indução espontânea de citocinas e maior número de vesículas produzidas pelas BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo na concentração de 25 µg/mL (Figuras 8 e 11), somente as vesículas obtidas nessa condição foram usadas.

O cultivo dos fagócitos primários na presença de VE-LL-37, na razão vesícula:célula igual a  $2,06 \times 10^7$ , assim como VE-LPS razão vesícula:célula igual a  $10^4$  por 48 horas induziu a produção das citocinas com um perfil semelhante ao promovido pelo tratamento das células

com o peptídeo LL-37 ou LPS (Figuras 8 e 9). Assim, exposição a VE-LL-37 levou a secreção significativa de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e CCL2 e VE-LPS de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, CCL2, IL-1 $\beta$  e IL-10 em BMDCs, quando comparados aos fagócitos não co-cultivados com as VEs (Figura 13A). Padrão semelhante foi observado também em BMDMs (Figura 13B). Esses resultados sugerem que o perfil de expressão de citocinas que as VE-LL37 induzem fornece sinal pró-inflamatório para DCs e macrófagos em repouso (não ativados previamente).

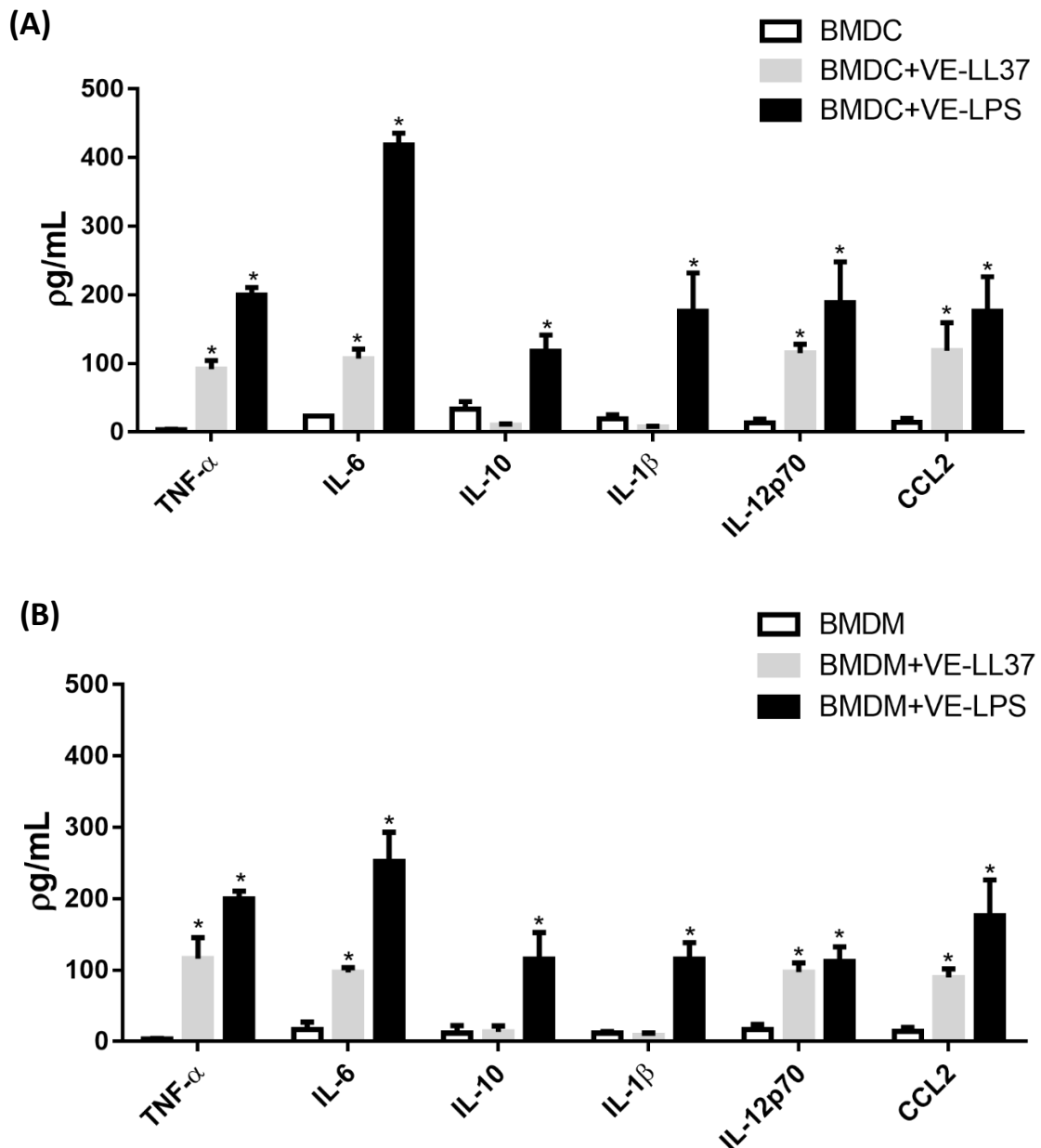
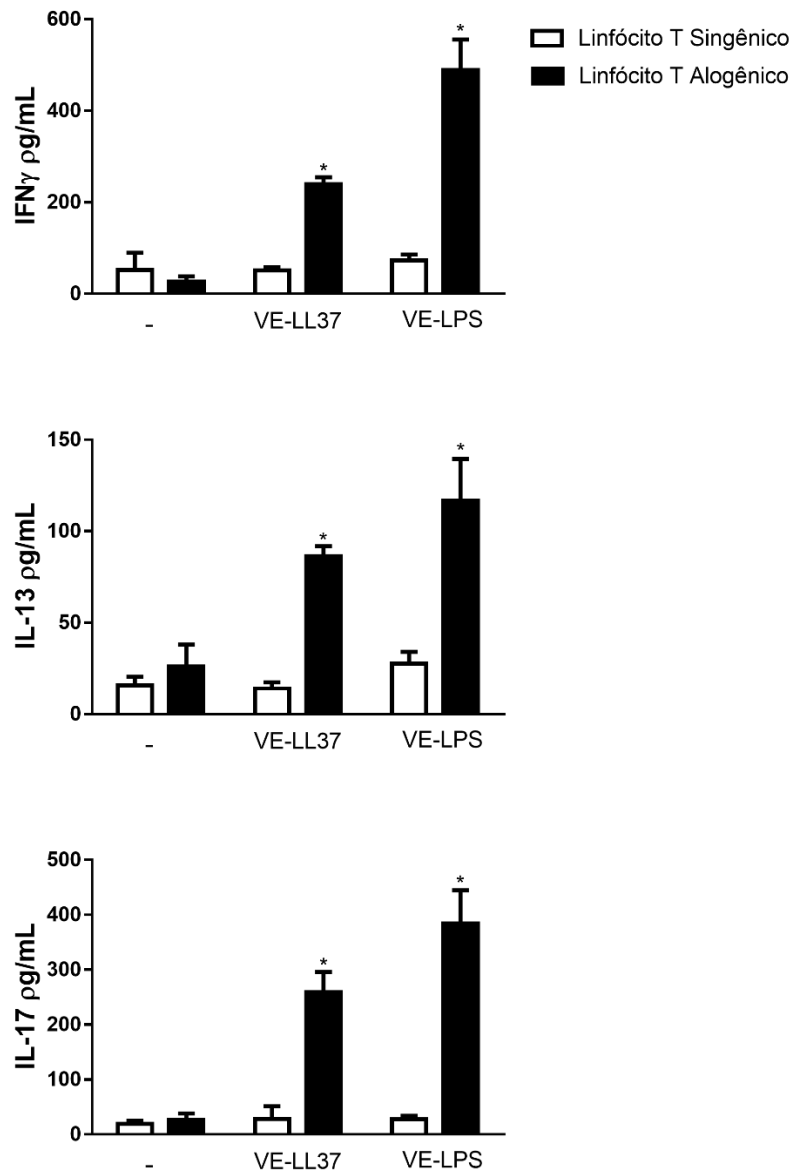


Figura 13. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias e CCL2 em fagócitos. BMDCs (A) e BMDMs (B) foram tratados com as VE-LL-37 e VE-LPS por 24 horas e o sobrenadante avaliado quanto a produção de citocinas. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos grupos BMDCs ou BMDMs. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

## **6. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativam linfócitos T alogênicos**

As vesículas derivadas de DCs e outras células apresentadoras de antígenos, humanas e murinas, podem apresentar em sua membrana moléculas funcionais MCH I e II, além de proteínas coestimulatórias, podendo induzir a ativação direta e indireta de linfócitos T (RAPOSO *et al*, 1996; THÉRY *et al*, 2002; SEGURA *et al*, 2005; TKACH *et al.*, 2017). Com intuito de ampliar a caracterização funcional das VE-LL-37, incubamos linfócitos T totais singênicos ou alogênicos derivados do baço de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/C, respectivamente, com as VEs (na razão VE-LL-37: linfócito T de  $2,06 \times 10^7$  e VE-LPS de  $1,0 \times 10^4$ ). Após 5 dias de cultura o sobrenadante foi coletado e a secreção de citocinas representativas das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> do Tipo 1 (IFN- $\gamma$ ), 2 (IL-13), ou 17 (IL-17) mensurada (Figura 14). Apesar de não termos avaliado a proliferação linfocitária, a produção de todas as citocinas estudadas foi induzida pelas VE-LL-37 e VE-LPS quando interagindo com linfócitos T alogênicos, e não com os singênicos, sugerindo que as VE-LL-37 induzem diretamente a ativação de linfócitos T alorreativos de forma MCH-dependente. Importante notar que foi observado um perfil de resposta celular predominantemente do tipo 1/17 ao consideramos a razão dos valores absolutos médios de IFN- $\gamma$  *versus* IL-13 (IFN- $\gamma$ /IL-13: 3,02) e IFN- $\gamma$ /IL-17 próximos a 1. Assim, esses resultados sugerem que as VE-LL-37 apresentam em sua membrana moléculas MHC funcionais (isto é, passíveis de reconhecimento pelos linfócitos T alorreativos) induzindo uma resposta de linfócitos do tipo 1/17.



**Figura 14. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) ativam linfócitos T alogênicos.** VE-LL37 e VE-LPS foram mantidas em cultura com linfócitos T singênicos e alogênicos obtidos do baço de camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/C, respectivamente. Após 5 dias o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-17 utilizando ELISA. Razão VE-LL37: linfócitos T de  $2,06 \times 10^7$  e VE-LPS de  $10^4$ ). \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos linfócitos não tratados com VEs. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

## **7. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) modulam a resposta de linfócitos T em reação mista de leucócitos empregando modelo de infecção *in vitro* por *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Considerando os resultados apresentados nas figuras 13 e 14, os quais sugerem uma atividade indutora da produção de IFN- $\gamma$  por VE-LL-37, avaliamos se essa atividade era mantida em um experimento de reação mista de leucócitos, utilizando o modelo de infecção *in vitro* por leveduras do fungo *P. brasiliensis*, estabelecido no Laboratório de Imunologia Aplicada IB/UnB (TAVARES *et al.*, 2012; 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2016). Para isso, BMDCs foram cultivadas com as VE-LL-37 nas mesmas condições dos experimentos da figura 13, isto é, na razão vesícula:fagócito igual a  $2,06 \times 10^7$  por 48 horas. Seguiu-se com a retirada do sobrenadante e infecção das BMDCs com leveduras de *P. brasiliensis* (razão BMDCs:fungo de 2:1). Após 6 horas, o sobrenadante foi coletado para retirada de leveduras não fagocitadas e linfócitos T do baço de camundongos singênicos, sem exposição prévia ao fungo, (na razão de linfócitos T:BMDCs de 10:1) foram adicionados à cultura. Após 5 dias de cultivo, o sobrenadante foi coletado e a secreção de citocinas representativas da resposta de linfócitos CD4+ ou CD8+ do Tipo 1 (IFN- $\gamma$ ), 2 (IL-13), ou 17 (IL-17) mensurada (Figura 15).

Como descrito (ALMEIDA & LOPES, 2001; DOS SANTOS *et al.*, 2011) a infecção de DCs pelo fungo promove uma ativação de linfócitos T predominantemente do tipo 2, evidenciado pela razão dos valores absolutos médios de IFN- $\gamma$ /IL-13: 0,33. Com o tratamento das BMDCs com as VE-LL-37 podemos observar uma reversão desse valor para 1,31 sugerindo um importante sinal pró-inflamatório fornecido pelas VEs, superando os efeitos modulatórios exercidos pelo fungo. Em relação a citocina IL-17, não houve modulação da sua secreção quando da adição das VE-LL-37 no co-cultivo. Assim, as VE-LL-37 alteram o perfil de diferenciação de subpopulações de linfócito T em uma reação mista de leucócitos.

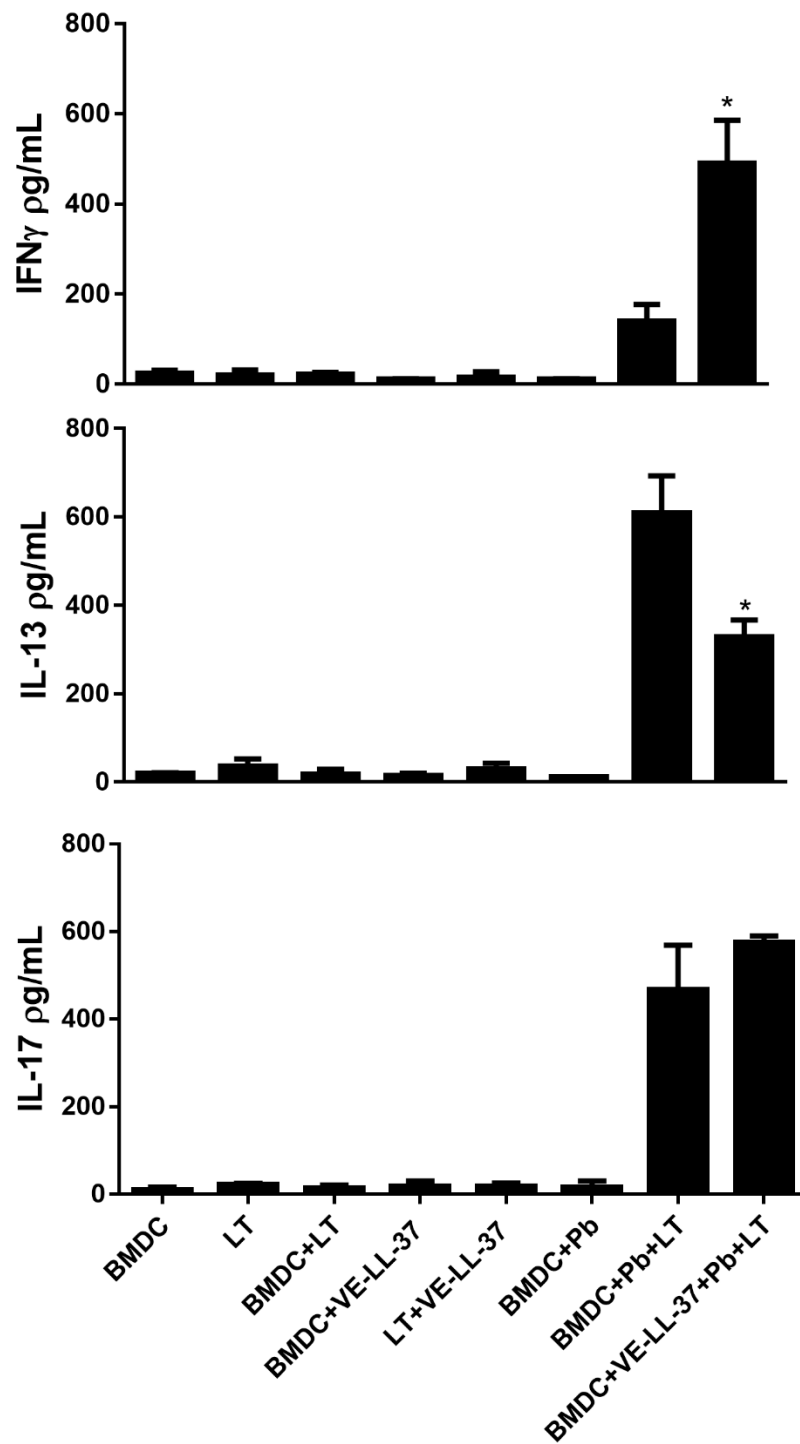
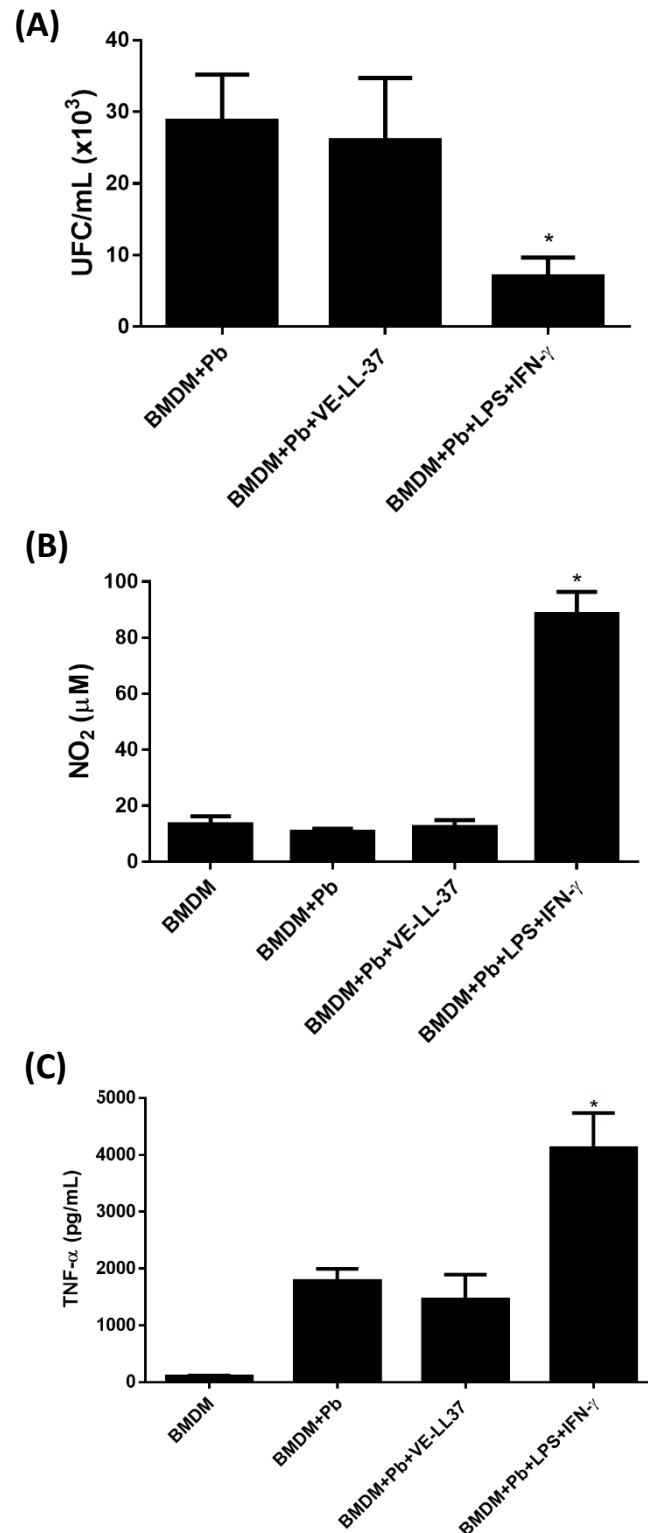


Figura 15. Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) modulam a resposta de linfócitos T para o tipo 1 no modelo de infecção *in vitro* por *Paracoccidioides brasiliensis*. BMDCs foram cultivadas com VE-LL37 (VE:fagócito:  $2,06 \times 10^7$ ) por 24 horas seguido pela infecção de *P. brasiliensis* (BMDCs:fungo de 2:1). Após 6 horas, linfócitos T do baço de camundongos singênicos foram adicionados ao cultivo de leucócitos (na razão de linfócitos T:BMDCs de 10:1). Após 5 dias o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13 e IL-17 utilizando ELISA. LT: linfócito T; Pb: *P. brasiliensis*. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo BMDCs+Pb+LT. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

## **8. Macrófagos infectados com o fungo *P. brasiliensis* não tem sua atividade fungicida modificada pelo tratamento com VE-LL-37**

O efeito imunomodulador das VE-LL-37 nas BMDCs e BMDMs (Figura 14 e 15) nos incitou a avaliar a função de macrófagos, novamente no modelo de infecção com *P. brasiliensis*, quando expostos a essas vesículas. Esse fungo atua como patógeno intracelular facultativo sendo capaz não só de sobreviver, mas também replicar no interior de macrófagos humanos e murinos não apropriadamente ativados (BRUMMER *et al*, 1988; 1989; MOSCARDI-BACCHI *et al*, 1994; TAVARES *et al*, 2007). Nesse sentido, BMDMs foram infectados com leveduras de *P. brasiliensis* na proporção de 2 macrófagos para cada fungo concomitante com o tratamento com VE-LL-37 (VE:fagócito de  $2,06 \times 10^7$ ). Após 48 horas de co-cultivo, o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico (*Nitric oxide*) e os BMDMs lisados para recuperação dos fungos intracelulares e avaliação de sua viabilidade por meio da quantificação das UFC. Como controle positivo de ativação da capacidade fungicida de macrófagos e produção de NO (na forma de nitrito), esses fagócitos foram tratados com LPS e IFN- $\gamma$ . BMDMs tratados com VE-LL-37 não tiveram sua capacidade fungicida modulada, como avaliado pela quantificação da carga fúngica viável (Figura 16A). Nota-se que os macrófagos controle tratado com LPS e IFN- $\gamma$  exibiram atividade fungicida significativa. Esses resultados são condizentes com aqueles observados nas Figuras 16B e 16C, onde podemos observar que as VE-LL-37 não foram capazes de modular a atividade das BMDMs e somente os macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  mostram produção significativa de NO, considerada a principal molécula fungicida associada ao *P. brasiliensis* (BOCCA *et al*, 1998; NASCIMENTO *et al.*, 2002), e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , quando comparado com os macrófagos somente infectados.





**Figura 16.** Vesículas derivadas de BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo (VE-LL-37) não alteram a capacidade fungicida, produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  por BMDMs infectados com *P. brasiliensis*. BMDMs foram infectados com *P. brasiliensis* (2:1) na presença de VE-LL-37 (VE:fagócito de  $2,06 \times 10^7$ ). Após 48 horas de co-cultivo, o sobrenadante foi coletado para avaliação da produção de TNF- $\alpha$  e de NO e os BMDMs lisados para quantificação de UFC. LPS: 500 ng/mL; IFN- $\gamma$  100 U/mL. Pb: *P. brasiliensis*. \* indica diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo BMDCs+Pb. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois ou três experimentos independentes conduzidos em triplicata.

## DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, tem-se destacado a habilidade de vesículas extracelulares derivadas de fagócitos humanos e murinos em influenciar as respostas imunológicas, impulsionando investigações para o seu potencial uso terapêutico. É sabido que a catelecidina LL-37 está presente, em altas concentrações, em respostas inflamatórias e que exerce ação imunomodulatória, entretanto, não há registros, do nosso conhecimento, de estudos publicados investigando VEs induzidas por peptídeos antimicrobianos. Assim, o presente estudo avaliou atividades funcionais das VEs induzidas por LL-37 em DCs.

O sucesso da resposta imunológica é dependente da função das APCs, em especial da captura e apresentação de antígenos pelas DCs e, não obstante, é notório que a sua diferenciação e estado de maturação sejam influenciados pelo meio em que se encontram. Embora os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estejam totalmente elucidados, o peptídeo LL-37 tem sido mostrado como um importante modulador da diferenciação e maturação de DCs e macrófagos, com importantes implicações biológicas e biotecnológicas (DAVIDSON *et al.*, 2004; VAN DER DOES *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2014; FINDLAY *et al.*, 2019).

DAVIDSON e colaboradores (2004), avaliando a diferenciação de monócitos humanos em DCs imaturas (iDCs) na presença de LL-37 observaram aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (principalmente CD86) e de receptores endocíticos e fagocíticos. Somente após maturação induzida com LPS das iDCs diferenciadas com LL-37, foi obtido DCs com produção significativamente maior de citocinas pró-inflamatórias e IL-12, quando comparado com as iDCs diferenciadas na ausência do peptídeo e tratadas com LPS. Dessa maneira, LL-37 modificaria a diferenciação de DCs, mas não ativaria ou induziria a maturação direta de iDCs. De forma similar, a diferenciação de DCs a partir da medula óssea de camundongos na presença de LL-37 alterou significativamente as BMDCs obtidas em diversos aspectos, como na expressão de moléculas coestimulatórias CD80 e CD40, capacidade migratória, apresentação antigênica e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, porém não induziu a produção de IL-12 diretamente (FINDLAY *et al.*, 2019). No nosso estudo, as BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 (LL-37-BMDCs) não produziram citocinas, como relatado acima. Porém, quando essas células foram submetidas ao tratamento adicional de LL-37 por 24 horas (LL-37-BMDCs+LL-37), observou-se produção significativa das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12p70 e da quimiocina CCL2, mesmo na ausência de estímulo por LPS. Contudo, é importante notar que a adição de LPS

elevou significativamente a secreção dessas citocinas. Considerando que as BMDC obtidas pelo protocolo de diferenciação empregado no presente trabalho são imaturas (MHC-II<sup>low</sup>) (vide Material e Métodos), os resultados, principalmente a produção de IL-12, sugerem que o tratamento adicional com LL-37 nas células diferenciadas na presença desse peptídeo promoveu a maturação celular. Imperativo, porém, é a avaliação da expressão de marcadores de maturação de DCs (CD80, CD86, CD40) para confirmar esse processo. Em macrófagos, a presença de LL-37 durante a sua diferenciação a partir de monócitos direciona essas células para um fenótipo M1 (pró-inflamatório). Esse fato ocorre mesmo quando a diferenciação é induzida por M-CSF, que diferentemente de GM-CSF induz a diferenciação de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório M2, sugerindo que a presença deste peptídeo exerça uma forte influência na plasticidade de macrófagos (VAN DER DOES *et al.*, 2010).

Além do aspecto pró-inflamatório evidenciado com os resultados acima, confirmamos a atividade anti-inflamatória da LL-37, ao tratarmos BMDCs com LPS e LL-37 simultaneamente, o que resultou na inibição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparado com as células tratadas somente com LPS. Essa atividade supressiva de LL-37 em LPS se deve principalmente ao fato do peptídeo se associar ao lipopolissacarídeo e regular negativamente a função de TLR4 (LARRICK *et al.*, 1995; ROSENFELD *et al.*, 2006; KANDLER *et al.*, 2006). Repressão similar foi observada na secreção de quimiocinas em células epiteliais (SCOTT *et al.*, 2002). Alternativamente, dependendo da ordem de exposição das células ao LL-37 e LPS, o efeito da LL-37 nas respostas mediada por TLR4 pode ser pró-inflamatória. Macrófagos estimulados com LPS antes da exposição a LL-37 tem a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentadas (SCOTT *et al.*, 2002; ELSSNER, *et al.*, 2004). Assim, a habilidade supressiva de LL-37 sob o LPS depende de quando e como as células são expostas a esse peptídeo. Coletivamente esses resultados nos levou a selecionar o grupo LL-37-BMDCs+LL-37 para obtenção das VEs (VE-LL-37) a partir de seu sobrenadante considerando seu potencial imunomodulador e terapêutico. Ademais, obtivemos VEs derivadas de BMDCs maduras (tratadas com LPS por 24 horas) diferenciadas na ausência de LL-37 (SEGURA *et al.*, 2005; SCHIERER *et al.*, 2018; BUCIO-LÓPEZ *et al.*, 2018).

Estudos *in vivo* indicam que as principais células-alvo de vesículas são os fagócitos. Após a introdução intranasal ou a injeção subcutânea de VEs derivadas de macrófagos infectados com *Mycobacterium* spp. foi observada a endocitose dessas vesículas por macrófagos e DCs (BHATNAGAR *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2012). Ademais, a administração endovenosa de VEs derivadas de DCs leva a sua captura por macrófagos e

DCs (MORELLI *et al.*, 2004; MONTECALVO *et al.*, 2008). Nesse sentido, com intuito de caracterizar funcionalmente as VE-LL-37, inicialmente avaliamos a capacidade dessas VEs em induzir a produção de citocinas nas próprias DCs e macrófagos, sem estímulos prévios. O cultivo desses fagócitos com VE-LL-37 ou VE-LPS induziu a produção das citocinas com um perfil semelhante ao promovido pelo tratamento das células com o peptídeo LL-37 (LL-37-BMDC+LL-37) ou LPS (BMDC+LPS), porém com valores absolutos reduzidos. Assim, a exposição a VE-LL-37 promoveu a secreção significativa de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70 e CCL2 enquanto que a exposição a VE-LPS induziu TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, CCL2, IL-1 $\beta$  e IL-10 não só em BMDCs, mas também em BMDMs. Esses resultados sugerem que VE-LL37 fornecem sinal pró-inflamatório para DCs e macrófagos com potencial para promover uma resposta celular do tipo 1, pois IL-12p70 sinergiza com TNF- $\alpha$  e outras citocinas para estimular a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T. Condizente com esses resultados, VEs secretadas por DCs humanas maduras (induzidas por IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) promovem a diferenciação de monócitos em DCs imaturas, com capacidade de produzir IL-12 e ativar linfócitos T (SCHIERER *et al.*, 2018). Esse mesmo trabalho demonstrou que VEs derivadas de BMDCs maduras pelo estímulo com LPS, quando introduzidas subcutaneamente em camundongos, atraiu linfócitos e monócitos que expressaram marcadores típicos de ativação de monócitos inflamatórios. Esse processo foi dependente de quimiocinas como a CCL2 (MCP-1). Ainda, VEs derivadas de macrófagos M1 induzem a secreção de citocinas promotoras de resposta Th1 (IL-12 e TNF- $\alpha$ ) em macrófagos e DCs murinas imaturas. Interessantemente, VEs de macrófagos M2, promovem a secreção de IL-4 e IL-10 por esses mesmos fagócitos (CHENG *et al.*, 2017). O fornecimento de sinal pró-inflamatório pelos exossomos M1 foi ainda confirmado *in vivo*, pela constatação dos níveis elevados das citocinas, como IFN- $\gamma$ , nos linfonodos após administração subcutânea das VEs derivadas de macrófagos M1. Assim, essas vesículas foram capazes de estabelecer um ambiente pró-inflamatório nos linfonodos favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa Th1 (CHENG *et al.*, 2017). DCs podem ainda ser alvo de vesículas derivadas de mastócitos que induzem não só a produção de IL-12, mas também promovem o aumento de marcadores de maturação de superfície (SKOKOS *et al.*, 2013). Finalmente, VEs induzidas pelo tratamento de camundongos com LPS pela via inalatória resulta na produção de IL-12 e IL-6 por DCs pulmonares, em um modelo de estudo de sensibilização a alérgenos nas vias aéreas (SHIN *et al.*, 2010).

Apesar dos efeitos imunomodulatórios das VEs derivadas de fagócitos serem bem conhecidos, como descrito acima, ainda é pouco compreendido quais componentes presentes

em VEs originadas dessas células, além de quais moléculas microbianas, podem regular seus efeitos modulatórios. No entanto, algumas moléculas foram identificadas como a *heat shock protein* (hsp) Hsp70, presente em VEs derivados de macrófagos da linhagem RAW264.7 infectadas por micobactéria, o que poderia contribuir para as propriedades pró-inflamatórias destas VEs (ANAND, 2010). Além disso, TNF- $\alpha$  e diversas quimiocinas (por exemplo, CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5) e miRNAs, com potenciais alvos envolvidos na sinalização mediada por TLR, foram identificados em VEs derivadas de macrófagos estimulados por LPS (McDONALD *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017). Em BMDCs com maturação induzida também por LPS, as VEs contêm diversas citocinas incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, GM-CSF, IL-8, MIP-3 $\beta$  e MIP-1a. Surpreendentemente, GM-CSF foi identificado na membrana das VEs o que poderia estimular receptores de GM-CSF nos monócitos. Nesse caso, esses receptores ainda funcionariam como sítios de ancoragem para as VEs. De fato, os autores demonstraram que uma concentração 170 vezes menor do GM-CSF associado as VEs eram necessários para diferenciar monócitos em DCs, quando comparado com a citocina livre (SCHIERER *et al.*, 2018). Por fim, VEs de mastócitos degranulados contêm proteases biologicamente ativas que poderiam influenciar a maturação proteolítica de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 em células-alvo (AFONINA *et al.*, 2015; GROOT *et al.*, 2016). Nesse contexto, trabalhos futuros avaliando o proteoma das VE-LL-37 poderiam levar a um melhor entendimento da atividade imunomodulatória relacionada a indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas VEs.

Outro aspecto essencial da avaliação funcional de VEs é considerar sua capacidade de ativar a resposta adaptativa. O fato das VEs derivadas de APCs como DCs, macrófagos e linfócitos B carregar material antigênico e expressar em sua superfície celular o complexo peptídeo-MHC e proteínas coestimulatórias para ativação de linfócitos T, sugere que as APCs podem modular as atividades desses linfócitos à distância. Além disso, o aumento da secreção de VEs após a interação com os linfócitos T reforça o conceito de que as VEs são importantes em fornecer parte dos efeitos imunoregulatórios das APCs (MUNTASELL *et al.*, 2007; BUSCHOW *et al.*, 2009; NOLTE-HOEN *et al.*, 2009).

O complexo peptídeo-MHC nas VEs pode ser apresentado aos linfócitos T de forma direta ou indireta (THÉRY *et al.*, 2002; MONTECALVO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016). Na primeira forma, os complexos peptídeo-MHC são diretamente reconhecidos pelos linfócitos T antígeno específico, enquanto que na forma indireta, as DCs receptoras das VEs adquirem antígenos ou os complexos peptídeo-MHC carregados pelas VEs e, então, os apresenta para os linfócitos T. Esse mecanismo indireto é requerido para a ativação de linfócitos T virgens

por VEs derivadas de DCs (THÉRY *et al*, 2002), enquanto linfócitos T pré-ativados (linfócitos de memória, por exemplo) podem ser ativados diretamente pelas VEs de DCs (NOLTE-´T HOEN *et al.*, 2009). Curiosamente, a eficiência da estimulação indireta de linfócitos T parece ser altamente dependente do estado de ativação das APCs do doador do qual derivam os exossomos. Por exemplo, os exossomos liberados de DCs tratados com LPS ou IFN- $\gamma$  (DCs maduras) têm expressão aumentada de ICAM-1 na superfície que, presumivelmente, aumenta sua captação pelas DCs e aumenta a expressão das moléculas de MHC e CD86, que contribuem para a ativação dos linfócitos. Assim, esses exossomos maduros têm uma maior capacidade de estimular células T em comparação com exossomos derivados de DC imaturas (SEGURA *et al.*, 2005; MANTASELL *et al* 2007; WAKIM *et al.*, 2011; VIAUD *et al.*, 2011).

No presente trabalho, a ativação direta dos linfócitos T, considerando a produção de citocinas características das subpopulações dessas células, foi somente alcançada quando as VEs foram cultivadas com os linfócitos T alogênicos. Assim, os linfócitos T reconheceriam as moléculas MHC I e II alogênicas presente nas VE-LL-37. Nas culturas, usamos linfócitos T totais de baço, ou seja, tanto linfócitos T virgens ou de memória do tipo auxiliar CD4+ e linfócitos T CD8+ estavam presentes. Dessa maneira, os linfócitos T de memória principalmente, ou ainda sinergizando com linfócitos virgens, reconheceram seus antígenos nas moléculas de MHC alogênicas presentes nas VE-LL-37 promovendo sua ativação, como descrito na apresentação de aloantígenos em células intactas em transplantes de órgãos em humanos (MORIMOTO *et al*, 1985; AKBAR *et al*, 1988, 1991). De fato, muitos dos linfócitos T que respondem a uma molécula de MHC alogênica, mesmo na primeira exposição, são linfócitos T de memória. É provável que estas células de memória tenham sido geradas durante a exposição prévia a outro antígeno (por exemplo, microbiano) e reagem de forma cruzada com as moléculas de MHC alogênicas. Importante notar a necessidade da avaliação da proliferação celular, usando CFSE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster), para melhor caracterização da ativação dos linfócitos em nosso trabalho.

Considerando que a ativação de linfócitos T resulta na secreção de diferentes citocinas, o que reflete seu estado de polarização, avaliamos o perfil dessas moléculas secretados pelos linfócitos T alorreativos. Para isso, a produção das principais citocinas representativas das subpopulações de linfócitos T do Tipo 1 (IFN- $\gamma$ ), 2 (IL-13), ou 17 (IL-17) foi quantificada. Observamos que a ativação dos linfócitos T totais pelas VE-LL-37 promoveu uma produção predominante de IFN- $\gamma$  e IL-17, associada a baixos níveis, porém

significativos, de IL-13 quando comparado com os linfócitos T não cultivados com as VEs. Apesar da ativação direta de linfócitos T parecer ter pouco impacto *in vivo*, esse experimento sugere que as VE-LL-37 expressam de forma correta moléculas MHC e intrinsicamente induzem uma resposta predominante do tipo 1 de linfócitos. Esse fato indica um importante atributo dessas vesículas para aplicações terapêuticas, ao por exemplo serem carregadas com antígenos específicos tumorais, para indução de resposta anti-tumor eficiente (SABADO *et al.*, 2015), como será discutido posteriormente.

No presente trabalho não caracterizamos o fenótipo dos linfócitos T (CD4 ou CD8+) em proliferação, dessa maneira, tantos os linfócitos T auxiliares (Th) como os citotóxicos, podem e devem estar associados ao perfil de citocinas observado. De fato, TKACH e colaboradores (2017) demonstrou que tanto linfócitos T CD4+ como CD8+ alogênicos foram ativados por VEs derivadas de DCs imaturas ou maduras pelo tratamento com IFN- $\gamma$ . Nesse trabalho, os autores compararam a capacidade de ativação de linfócitos T e o perfil de citocinas induzidas por VEs de diferentes tamanhos (obtidas por ultracentrifugação diferencial sucessiva) produzidas pelas DCs em distintos estados de maturação. Foi constatado que as VEs de diferentes tamanhos ativam de forma similar os linfócitos T. Entretanto, quando secretadas por DCs imaturas, as VEs de maior diâmetro (>200 nm) diferem das menores quanto à polarização da resposta de linfócitos T, de tal forma que as primeiras favorecem a secreção de citocinas do tipo 2, enquanto que as últimas do tipo 1 (IFN- $\gamma$ ). Ademais, o bloqueio da interação CD40-CD40L ou de DC-SIGN diminui a resposta induzida pelas VEs pequenas, enquanto que o bloqueio de CD80 diminui a resposta promovida pelas de maior tamanho. Entretanto, quando as VEs são obtidas de DCs maduras essas diferenças funcionais são suprimidas já que todas as VEs, independentes do tamanho, se tornam capazes de induzir IFN- $\gamma$ . Esses dados apoiam nossos resultados já que utilizamos não só apenas a fração de VE-LL-37 até 200 nm (VEs pequenas), como também, VEs derivadas de DCs consideradas maduras. Os resultados obtidos por TKACH e colaboradores (2017) sugerem a necessidade de comparar a funcionalidade dos diferentes subtipos de VEs em sistemas fisiológicos ou patológico onde atuam de forma relevante. Tais estudos podem ser críticos para determinar quais VEs devem ser usadas como ferramentas terapêuticas ou alvos na pesquisa clínica.

Considerando nossos resultados que sugerem a indução da produção de IFN- $\gamma$  por VE-LL-37, avaliamos se essa atividade era mantida em um experimento de reação mista de leucócitos utilizando o modelo de infecção *in vitro* de BMDCs por leveduras do fungo termodimórfico *P. brasiliensis* (TAVARES *et al.*, 2012; 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2015). Esse

modelo torna-se particularmente relevante ao presente trabalho, pois o *P. brasiliensis* inibe a secreção de IL-12 por DCs, a principal citocina envolvida na indução de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, ao bloquear a transcrição da subunidade p35 específica dessa citocina (TAVARES *et al.*, em preparação). Além disso, o fungo prejudica a expressão de MHC de classe II e das moléculas coestimulatórias CD54, CD80 e CD86, em DCs (BOCCA *et al.*, 1998; ALMEIDA & LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004), diminuindo a apresentação antigênica a linfócitos T virgens e culminando em uma menor capacidade de desenvolver uma resposta adaptativa protetora (Th1) pelo hospedeiro (DOS SANTOS, FERREIRA & ALMEIDA, 2011).

O experimento envolveu o tratamento inicial de BMDCs com as VE-LL-37 seguido da infecção pelas leveduras do fungo e adição dos linfócitos T totais à reação. Foi observado a reversão de uma resposta celular predominante do tipo 2 imposta pelo fungo, como esperado, para uma do tipo 1 caracterizado pela significativa maior produção de IFN- $\gamma$  na cultura de BMDCs tratadas com VE-LL-37. Dessa maneira, o tratamento prévio das BMDCs com as VE-LL-37 excedeu os efeitos inibitórios promovidos pelo fungo. Apesar de não termos avaliados as citocinas relacionadas às células imunes inatas (BMDCs) no sobrenadante da reação mista de leucócitos, esse resultado provavelmente está relacionado a indução da secreção de citocinas pelas VE-LL-37 que direcionam para o desenvolvimento da subpopulação de linfócitos T do tipo 1, particularmente IL-12 e TNF- $\alpha$ , como descrito acima.

A caracterização funcional das VE-LL-37 foi ainda avaliada empregando novamente a infecção de fagócitos pelo *P. brasiliensis*. Considerando a indução de citocinas pelas VE-LL-37 nas BMDCs e BMDMs, avaliamos atividades funcionais desses macrófagos, quando expostos às vesículas. Macrófagos humanos e murinos não ativados por citocinas como IFN- $\gamma$  são permissíveis a sobrevivência e replicação intracelular desse fungo (BRUMMER *et al.*, 1988; 1989; MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1994; TAVARES *et al.*, 2007). Nesse contexto, BMDMs foram infectados com *P. brasiliensis* concomitante com o tratamento com VE-LL-37 por dois dias, quando então os macrófagos foram lisados para recuperação dos fungos intracelulares e avaliação da carga fúngica. BMDMs tratados com VE-LL-37 não tiveram sua capacidade fungicida modulada, o que corrobora o achado de que as VE-LL-37 não modificaram a produção de TNF- $\alpha$  e de NO (indicativos de ativação de macrófagos), como verificado no sobrenadante do co-cultivo. O NO, derivado da atividade catalítica do óxido nítrico sintase induzida (iNOS), expressa principalmente em macrófagos, é a principal molécula fungicida associada ao *P. brasiliensis in vitro* e *in vivo* (BOCCA *et al.*, 1998;



NASCIMENTO *et al.*, 2002). A avaliação da exposição dos macrófagos às VE-LL-37, prévia ou posteriormente ao estabelecimento da infecção pelo fungo, pode colaborar no entendimento do mecanismo associado a deficiência da atividade modulatória dessas vesículas. É interessante notar que as VEs secretadas pelo próprio *P. brasiliensis* podem modular a resposta imune inata e afetar a relação entre esse fungo e células imunes do hospedeiro (da SILVA *et al.*, 2016). As VEs secretadas pelo *P. brasiliensis* induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos murinos. Além disso, o cultivo dos macrófagos com as VEs também promove um fenótipo de polarização M1, associado a uma atividade fungicida aumentada.

Um grande interesse no uso de VEs em aplicações terapêuticas surgiu a partir do trabalho pioneiro de ZITVOGEL e colaboradores (1998), onde foi demonstrado que as VEs derivadas de DCs pulsadas (estimuladas) com peptídeos tumorais promoveriam a indução de respostas imunológicas antitumorais dependentes de linfócitos T citotóxicos CD8+ em camundongos *in vivo*. Essa mesma abordagem terapêutica implica no carregamento direto de peptídeos tumorais no complexo MHC presente nas vesículas secretadas por DCs *ex vivo* para então serem introduzidas (*cell-free*) no indivíduo para ativar linfócitos T tumor específico de forma otimizada nos linfonodos (SABADO *et al.*, 2015; GREENING *et al.*, 2015). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como VEs derivadas de DCs apresentam seus antígenos complexada às moléculas de MHC para estimular as respostas antitumorais. Essas VEs, como já comentado, podem estimular os linfócitos T diretamente *in vitro*, embora pareça que esse mecanismo funciona de forma mais eficiente como um reestímulo de linfócitos T ativados ou de memória (RAPOSO *et al.*, 1996; ADYMIRE *et al.*, 2006). Além disso, essa estimulação direta de linfócitos T por VEs derivadas de DCs parece ser ineficiente para ativar linfócitos virgens (MUNTASELL *et al.*, 2007), e é improvável que ocorra de forma significativa *in vivo* (MONTECALVO *et al.*, 2008). Em vez da forma direta de ativação, diversas evidências sugerem que as VEs derivadas de DCs estimulam a ativação de linfócitos T de forma mais eficiente via apresentação antigênica indireta por meio da internalização, por fagocitose ou macropinocitose, das VEs por APCs receptoras. Após a internalização, os complexos peptídeo-MHC das VEs podem ser reprocessados pelas vias endossômicas dentro da APC, resultando na transferência de peptídeos antigênicos do MHC das VEs para os MHCs das APCs no tecido linfoide (MALLEGOL *et al.*, 2007; MONTECALVO *et al.*, 2008). Nesse contexto, a aplicação terapêutica de VEs requer seu isolamento de DCs pulsadas com antígenos tumorais *ex vivo*, permitindo a modificação dessas células parentais para aumentar os seus efeitos imunorregulatórios. As DCs podem

então ser cultivadas em condições que as mantenham em um estado maduro, resultando em VEs estimulatórias, por meio da expressão aumentada de moléculas coestimulatórias e, complexos MHC e citocinas pró-inflamatórias, o que levaria a maior capacidade de ativar as APCs no tecido linfóide e promover ativação eficiente de linfócitos T virgens antitumorais. No presente trabalho, mostramos que as VE-LL-37 ativam as APCs (BMDCs e BMDMs) para produção de citocinas pró-inflamatórias e IL-12 acompanhado da capacidade de induzir a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T. Essa citocina apresenta importante papel antitumoral (BARTH *et al.*, 1991; DUNN *et al.*, 2004) sendo associada a ambas respostas dependentes de linfócitos T CD4+ e CD8+ (TEIXEIRA *et al.*, 2005; SZABO *et al.*, 2002) e essencial para a produção de linfócitos T CD8+ de memória de vida longa (JANSSEN *et al.*, 2003; SHEDLOCK *et al.*, 2003). Assim, apesar de ainda preliminares, os nossos resultados fundamentam a necessidade de uma caracterização aprofundada das VE-LL-37 para serem avaliadas como potencial veículo terapêutico de peptídeos tumorais de modo a incitar resposta de linfócitos T. Uma recente publicação reforça esse potencial ao sugerir a adição de LL-37 ao meio de diferenciação e maturação de DCs autólogos usados na imunização de pacientes para promover resposta de linfócitos T antitumoral (FINDLAY *et al.*, 2019). Os autores demonstraram que LL-37 induziu a expansão preferencial de DCs do fenótipo CD103+/CD141+, um dos principais subtipos de DCs responsável por migrar e ativar linfócitos T CD8+ antitumorais nos linfonodos (ROBERTS *et al.*, 2016). Adicionalmente, essas DCs tratadas com LL-37 apresentaram capacidade migratória aumentada e subsequente maior ativação de linfócitos T CD8+ com produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* e *in vivo* em um modelo de carcinoma espinocelular (carcinoma de células escamosas) (FINDLAY *et al.*, 2019).

## CONCLUSÕES

1. BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo produzem citocinas pró-inflamatórias
2. BMDCs diferenciadas na presença de LL-37 e tratadas com esse peptídeo produzem VEs (VE-LL-37) em maior concentração e menor tamanho comparado as VEs obtidas de BMDCs tratada com LPS (VE-LPS)
3. O tratamento de BMDCs e BMDMs com VE-LL-37 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-12, determinando um potencial de ativação de linfócitos Th1
4. VE-LL-37 ativam diretamente linfócitos T alorreativos e induzem a produção de citocinas
5. VE-LL-37 modulam a resposta de linfócitos T em reação mista de leucócitos empregando modelo de infecção *in vitro* por *Paracoccidioides brasiliensis*
6. Macrófagos infectados com o fungo *P. brasiliensis* não tem sua atividade fungicida modificada pelo tratamento com VE-LL-37

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMYRE, C., JOHANSSON, S. M., PAULIE, S., GABRIELSSON, S. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. **Eur J Immunol.**, 36(7):1772–1781, 2006.
- ADMYRE, C.; JOHANSSON, S. M.; QAZI, K. R.; FILÉN, J.-J.; LAHESMAA, R.; NORMAN, M.; NEVE, E. P.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1969-1978, 2007.
- AFONINA, I. S., MÜLLER, C., MARTIN, S. J., BEYAERT, R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. **Immunity**,42(6):991-1004, 2015.
- AGOUTI, I., COINTE, S., ROBERT, S., *et al.* Platelet and not erythrocyte microparticles are procoagulant in transfused thalassaemia major patients. **Br J Haematol.**, Nov;171(4):615–24, 2015.
- AKBAR, A. N., TERRY, L., TIMMS, A., BEVERLEY, P. C., JANOSSY, G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. **J Immunol.**, 140(7):2171-8, 1988.
- AKBAR, A. N., SALMON, M., IVORY, K., TAKI, S., PILLING, D., JANOSSY, G. Human CD4+CD45R0+ and CD4+CD45RA+ T cells synergize in response to alloantigens. **Eur J Immunol.**, 21(10):2517-22, 1991.
- AKERS, J. C., GONDA, D., KIM, R., *et al.* Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **J Neurooncol.**, 113:1–11, 2013.
- ALEMAN, M. M., GARDINER, C., HARRISON, P., *et al.* Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. **J Thromb Haemost.**, Nov 9 (11):2251–61, 2011.
- ALEXANDRE-RAMOS, D. S., SILVA-CARVALHO, A. E., LACERDA, M. G., SEREJO, T. R. T. *et al.* LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 108, 1584–1590, 2018.
- ALMEIDA, S. R., LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz J Med**

**Biol Res.**, 34(4):529-37, 2001.

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 717 (p. 1-8), 2011.

ALMQVIST, N.; LÖNNQVIST, A.; HULTKRANTZ, S.; RASK, C.; TELEMO, E. Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. **Immunology**, v. 125, n. 1, p. 21-27, 2008.

ALVAREZ-ERVITI, L.; SEOW, Y.; YIN, H.; BETTS, C.; LAKHAL, S.; WOOD, M. J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 341-345, 2011.

ANAND, P. K., ANAND, E., BLECK, C. K., ANES, E., GRIFFITHS, G. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. **PLoS One**, 2010; 5: e10136, 2010.

ANDRÉ, F., CHAPUT, N., SCHARTZ, N. E., FLAMENT, C., AUBERT, N., BERNARD, J., LEMONNIER, F., RAPOSO, G., ESCUDIER, B., HSU, D. H., *et al.* Exosomes as potent cell-free peptidebased vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. **J. Immunol**, 172:2126–2136 2004.

BABST, M. A protein's final ESCRT. **Traffic**, 6:2–9, 2005.

BACHEM, A., HARTUNG, E., GUTTLER, S., MORA, A., ZHOU, X., HEGEMANN, A., PLANTINGA, M., MAZZINI, E., STOITZNER, P., GURKA, S., *et al.* Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. **Front Immunol.**, 3:214, 2012.

BALS, R., WEINER, D. J., MOSCIONI, A. D., MEEGALLA, R. L., WILSON, J. M. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. **Infect Immun.**, 67:6084–6089, 1999.

BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y.-J., PULENDRAN, B., PALUCKA, K. Immunobiology of Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, 18(1), 767–811, 2000.

BARD, M. P., HEGMANS, J. P., HEMMES, A., LUIDER, T. M., WILLEMSSEN, R., SEVERIJNEN, L. A., VAN MEERBEECK, J. P., BURGERS, S. A., HOOGSTEDEN, H. C., AND LAMBRECHT, B. N. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 31:114–121, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BARTHR, J. JR., MULE, J. J., SPIESS, P. J., ROSENBERG, S. A. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp. Med.*, 173:647–58, 1991.

BEBELMAN, M. P., SMIT, M. J., PEGTEL, D. M., BAGLIO, R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, 188. Feb 21; 1-11, 2018.

BECKER, M., GUTTNER, S., BACHEM, A., HARTUNG, E., MORA, A., JAKEL, A., HUTLOFF, A., HENN, V., MAGES, H. W., GURKA, S., *et al.* Ontogenic, phenotypic, and functional characterization of XCR1(+) dendritic cells leads to a consistent classification of intestinal dendritic cells based on the expression of XCR1 and SIRPalpha. **Front Immunol.**, 5:326, 2014.

BERCKMANS, R. J., STURK, A., VAN TIENEN, L. M., SCHAAP, M. C., NIEUWLAND, R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. **Blood**, 117:3172– 3180, 2011.

BERGMAN, P., WALTER-JALLOW, L., BROLIDEN, K., AGERBERTH, B., SODERLUND, J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. **Curr. HIV Res.**, 5: 410–415, 2007.

BEYER, C.; PISETSKY, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, 6:21–29, 2010.

BHATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F. J.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234-3244, 2007.

BIANCO, F., PERROTTA, C., NOVELLINO, L., FRANCOLINI, M., RIGANTI, L., MENNA, E., *et al.* Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. **The EMBO Journal**, 28, pp. 1043-1054, 2009.

BLANCHARD, N., LANKAR, D., FAURE, F., REGNAULT, A., DUMONT, C., RAPOSO, G., HIVROZ, C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. **J Immunol**, 168:3235–3241, 2002.

BOBRIE, A., COLOMBO, M., RAPOSO, G. and THÉRY, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, 12:1659 –1668, 2011.

BOCCA, A. L., HAYASHI, E. E., PINHEIRO, A. G., FURLANETTO, A. B., CAMPANELLI, A. P., CUNHA, F. Q., FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, 161:3056-3063, 1998.

BOMBERGER, J. M.; MACEACHRAN, D. P.; COUTERMARSH, B. A.; YE, S.; O'TOOLE, G. A.; STANTON, B. A. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000382-e1000382, 2009.

BOOTH, A. M., FANG, Y., FALLON, J. K., YANG, Jr-M., HILDRETH, JEK., GOULD, S. J. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. **J. Cell Biol.**, Mar 6;172(6):923–35, 2006.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; LAU, Y. E.; LEE, K.; SCOTT, M. G.; HANCOCK, R. E. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of leukocyte biology*, v. 77, n. 4, p. 451-9, Apr 2005.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; SCOTT, M. G.; HANCOCK, R. E. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1727-32, May 2005.

BOWDISH, D. M. E., DAVIDSON, D. J., SPEERT, D. P., HANCOCK, R.E. W. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. **J. Immunol.**, 172: 3758–3765, 2004.

BUCIO-LÓPEZ, L., PIÑÓN-ZÁRATE, G., JARQUÍN-YÁÑEZ, K., HERNÁNDEZ-TÉLLEZ, B., HERRERA-ENRÍQUEZ, MÁ, *et al.* Phenotype of Exosomes Derived from Dendritic Cells Treated with Different Stimuli. **J Immunol Clin Res.**, 5(1): 1046, 2018.

BURTON, J. O., HAMALI, H. A., SINGH, R., *et al.* Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients. **PLoS One**. Jan;8(8): e72663, 2013.

BUSCHOW, S. I., NOLTE-'T HOEN, E. N., VAN NIEL, G., POLS, M. S., TEN BROEKE, T., LAUWEN, M., OSSENDORP, F., MELIEF, C. J., RAPOSO, G., WUBBOLTS, R., *et al.* MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. **Traffic**, 10:1528 –1542, 2009.

BRAVO, M. O., CARVALHO, J. L., SALDANHA-ARAÚJO, F. Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. **Purinergic Signalling**, 12(4): 595-609, 2016.

BREWER, M. T., AGBEDANU, P. N., ZAMANIAN, M., DAY, T. A., CARLSON, S. A. Evidence for a bacterial lipopolysaccharide-recognizing G-protein-coupled receptor in the

bacterial engulfment by *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell.**, 12(11):1433–1438, 2013.

BRINTON, L. T.; SLOANE, H. S.; KESTER, M.; KELLY, K. A. Formation and role of exosomes in cancer. **Cell Mol Life Sci**, Oct 22 2014.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature reviews. **Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-50, Mar 2005.

BÖING, A. N., VAN DER POL, E., GROOTEMAAT, A. E., *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. **J Extracell vesicles.**, Jan;3, 2014.

BROZ, M. L., BINNEWIES, M., BOLDAJIPOUR, B., NELSON, A. E., POLLACK, J. L., ERLE, D. J., BARCZAK, A., ROSENBLUM, M. D., DAUD, A., BARBER, D. L., *et al.* Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. **Cancer Cell.**;26(5):638–652, 2014.

BROWN, K. L.; POON, G. F.; BIRKENHEAD, D.; PENA, O. M.; FALSAFI, R.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; BYLUND, J.; HANCOCK, R. E.; JOHNSON, P. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5497-505, May 1 2011.

BRUMMER, E., HANSON, L. H., STEVENS, D. A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **Int J Immunopharmacol.**;10(8):945-52, 1988.

BRUMMER, E., HANSON, L. H., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect Immun.**, Aug;57(8):2289-94, 1989.

BUCKI, R., JANMEY, P. A. Interaction of the Gelsolin-Derived Antibacterial PBP 10 Peptide with Lipid Bilayers and Cell Membranes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50:2932–2940, 2006.

CABY, M. P.; LANKAR, D.; VINCENDEAU-SCHERRER, C.; RAPOSO, G.; BONNEROT, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International immunology**, v. 17, n. 7, p. 879-887, 2005.

CALICH, V. L. G., PINA, A., FELONATO, M., BERNARDINO, S., COSTA, T. A., LOURES, F. V. Toll-like receptors and fungal infection: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 53: 1–7, 2008.



CHAPUT, N. et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. **J. Immunol.**, 172, 2137–2146, 2004.

CHAPUT, N., THÉRY, C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. **Semin Immunopathol**, 33:419 – 440, 2011.

CHARGAFF, E., WEST, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **J Biol Chem**. Nov;166(1):189–97, 1946.

CHEN, K., LIU, M., LIU, Y., WANG, C., YOSHIMURA, T., GONG, W., LE, Y., TESSAROLLO, L., and WANG, J. M. Signal relay by CC chemokine receptor 2 (CCR2) and formylpeptide receptor 2 (Fpr2) in the recruitment of monocyte-derived dendritic cells in allergic airway inflammation. **J. Biol. Chem.**, 288, 16262–16273, 2013.

CHEN K., XIANG, Y., HUANG, J., GONG, W., YOSHIMURA, T., JIANG, Q., TESSAROLLO, L., LE, Y., WANG, J. M. The formylpeptide receptor 2 (Fpr2) and its endogenous ligand cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) promote dendritic cell maturation. **The J. Biol. Chem.**, 289 (25):17553-17563, 2014.

CHEN, X., T. TAKAI, Y. XIE, F. NIYONSABA, K. OKUMURA, H. OGAWA. Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 433: 532–537, 2013.

CHENG, L., WANG, Y., HUANG, L. Exosomes from M1-polarized macrophages potentiate the cancer vaccine by creating a proinflammatory microenvironment in the lymph node. **Mol Ther**, 25:1665–1675, 2017.

CHIANG, N., FIERRO, I. M., GRONERT, K., SERHAN, C. N. Activation of lipoxin A4 receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. **J. Exp. Med.**, 191, 1197–1208, 2000.

CHRISTERSSON, C., JOHNNELL, M., SIEGBAHN, A. Evaluation of microparticles in whole blood by multicolour flow cytometry assay. **Scand J Clin Lab Invest.**, Apr;73(3):229–39, 2013.

CIORNEI, C. D.; EGESTEN, A.; BODELSSON, M. Effects of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release from rat aorta in vitro. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica.**, v. 47, n. 2, p. 213-20, Feb 2003a.

COCUCCI, E., RACCHETTI, G., MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no

more. **Trends Cell Biol** 19:43–51, 2009.

COFFELT, S. B., MARINI, F. C., WATSON, K., ZWEZDARYK, K. J., DEMBINSKI, J. L., LAMARCA, H. L., TOMCHUCK, S. L., HONER ZU BENTRUP, K., DANKA, E. S., HENKLE, S. L., SCANDURRO, A. B. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 106: 3806–3811, 2009.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 30, p. 255-89, Oct 11 2014.

CONNOLLY, K. D., WILLIS, G. R., DATTA, D. B. N., *et al.* Lipoprotein-apheresis reduces circulating microparticles in individuals with familial hypercholesterolemia. **J Lipid Res.**, Oct; 55(10):2064–72, 2014.

CONNOR, D. E., EXNER, T., MA, D. D.F., *et al.* The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. **Thromb Haemost.** May;103(5):1044–52, 2010.

CONSORTIUM, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57-74, 2012.

COSTA-SILVA, B.; AIELLO, N. M.; OCEAN, A. J.; SINGH, S.; ZHANG, H.; THAKUR, B. K.; BECKER, A.; HOSHINO, A.; MARK, M. T.; MOLINA, H. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature cell biology**, 2015.

COUPER, K. N.; BARNES, T.; HAFALLA, J.; COMBES, V.; RYFFEL, B.; SECHER, T.; GRAU, G. E.; RILEY, E. M.; DE SOUZA, J. B. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 1, p. e1000744, 2010.

CROZAT, K., GUITON, R., GUILLIAMS, M., HENRI, S., BARANEK, T., SCHWARTZ-CORNIL, I., MALISSEN, B., DALOD, M. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. **Immunol Rev.**; 234(1):177–198, 2010.

DALEKE, D. L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. **J Lipid Res.**, Feb 1;44(2):233–42, 2003.

DAVIDSON, D. J.; CURRIE, A. J.; REID, G. S.; BOWDISH, D. M.; MACDONALD, K.

L.; MA, R. C.; HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1146-56, Jan 15 2004.

DAVIES, R. T., KIM, J., JANG, S. C., *et al.* Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. **Lab Chip**, Dec 21;12(24):5202–10, 2012.

DEREGIBUS, M. C., CANTALUPPI, V., CALOGERO, R., *et al.* Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. **Blood**, Oct 1;110(7):2440–8, 2007.

DEUN, J. V., MESTDAGH, P., AGOSTINIS, P., AKAY, O., ANAND, S., ANCKAERT, J., MARTINEZ, Z. A. *et al.* EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. **Nature Methods**, 14(3), 228–232, 2017.

DI NARDO, A., BRAFF, M. H., TAYLOR, K. R., NA, C., GRANSTEIN, R. D., CINTURFF, J. E., KRUTZIK, S., MODLIN, R. L., GALLO, R. L. 2007. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. **J. Immunol.**, 178: 1829–1834, 2007.

DI VIZIO, D., KIM, J., HAGER, M. H., *et al.* Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. **Cancer Res.**, Jul 1;69(13):5601–9, 2009.

DÖRMANN, P.; KIM, H.; OTT, T.; SCHULZE-LEFERT, P.; TRUJILLO, M.; WEWER, V.; HUECKELHOVEN, R. Cell-autonomous defense, re-organization and trafficking of membranes in plant–microbe interactions. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 815-822, 2014.

DOS SANTOS, S. S., FERREIRA, K. S., ALMEIDA, S. R. *Paracoccidioides brasiliensis*-induced migration of dendritic cells and subsequent T-cell activation in the lung-draining lymph nodes. **PLoS One**,6(5): e19690, 2011.

DRAGOVIC, R. A., GARDINER, C., BROOKS, A. S., TANNETTA, D. S., FERGUSON, D. J., HOLE, P., CARR, B., REDMAN, C. W., HARRIS, A. L., DOBSON, P. J., *et al.* Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine**, 7:780 –788, 2011.

DUNN, G. P., OLD, L. J., SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immune editing. **Immunity**, 21:137–48, 2004.

DURR, U. H.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et biophysica acta**,

1758(9):1408-25, sep 2006.

ELSSNER, A., DUNCAN, M., GAVRILIN, M., WEWERS, M. D. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 b processing and release. **J. Immunol.**, 172: 4987–4994, 2004.

ERDAG, G.; MORGAN, J. R. Interleukin-1alpha and interleukin-6 enhance the antibacterial properties of cultured composite keratinocyte grafts. **Annals of surgery**, v. 235, n. 1, p. 113-24, Jan 2002.

ESCUDIER, B., DORVAL, T., CHAPUT, N., *et al.* Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived exosomes: results of the first phase I clinical trial. **J Transl Med**, 3: 10, 2005.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861-874, 2011.

FALATI, S., LIU, Q., GROSS, P., *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand I and platelet P-selectin. **J. Exp. Med.**, 197(11):1585-1598, 2003.

FENG, D., ZHAO, W-L., YE, Y-Y., *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. **Traffic**, May;11(5):675–87, 2010.

FERNÁNDEZ-MESSINA, L.; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; RIVAS-GARCÍA, E.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; DE LA FUENTE, H. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. **Biology of the Cell**, 2015.

FERREIRA, K. S., LOPES, J. D., ALMEIDA, S. R. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol Lett.**, 94(1-2):107-14, 2004.

FINDLAY, E. G., CURRIE, A. J., ZHANG, A., OVCIARIKOVA, J., YOUNG, L., STEVENS, H., MCHUGH, B. J., CANEL, M., GRAY, M., MILLING, S. W. F., CAMPBELL, J. D. M., SAVILL, J., SERRELS, A., DAVIDSON, D. J. Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy, **OncoImmunology**, 8:8, 1608106, 2019.

FRIES, E., ROTHMAN, J. E. Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Jul;77(7):3870–4, 1980.

GATTI, J.-L.; MÉTAYER, S.; ELGHAZI, M.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.-L.

Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 6, p. 1452-1465, 2005.

GILLIET, M., LANDE, R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. **Curr. Opin. Immunol.**, 20, 401–407, 2008.

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: e2461, 2008.

GKEKA, P.; SARKISOV, L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. **The journal of physical chemistry. B**, v. 114, n. 2, p. 826-39, Jan 21, 2010.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, 2013.

GREEN, L. C., TANNENBAUM, S. R., GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, Apr 3;212(4490):56-8, 1981.

GREENING, D. W., GOPAL, S. K., XU, R., SIMPSON, R. J., CHEN, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. **Semin Cell Dev Biol.**, Apr; 40:72-81, 2015.

GROOT, K. T., ARKESTEIJN, G. J., VAN DE LEST, C. H., GEERTS, W. J., GOERDAYAL, S. S., ALTELAAR, M. A., REDEGELD, F. A., NOLTE-'T HOEN, E. N., WAUBEN, M. H. Mast Cell Degranulation Is Accompanied by the Release of a Selective Subset of Extracellular Vesicles That Contain Mast Cell-Specific Proteases. **J Immunol.**, 197(8):3382-3392, 2016.

GROSS, J. C.; CHAUDHARY, V.; BARTSCHERER, K.; BOUTROS, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. **Nature cell biology**, v. 14, n. 10, p. 1036-1045, 2012.

GUSTAFSON, C. M., SHEPHERD, A. J., MILLER, V. M., *et al.* Age- and sex-specific differences in blood- borne microvesicles from apparently healthy humans. **Biol Sex Differ.**, Jan; 6:10, 2015.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T. G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ, V.; PÁLLINGER, E.; PAP, E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 16, p. 2667-88, Aug, 2011.

HA, T. Y. MicroRNAs in Human Diseases: From Lung, Liver and Kidney Diseases to Infectious Disease, Sickle Cell Disease and Endometrium Disease. **Immune Network**, v. 11, n. 6, p. 309, 2011.

HAO, S., BAI, O., LI, F., YUAN, J., LAFERTE, S., XIANG, J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and anti-tumour immunity. **Immunology**, 120:90–102, 2007.

HANCOCK, R.E.W., DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. **Trends Microbiol** 9, 402–410, 2000.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8856-61, Aug 1, 2000.

HANCOCK, R. E.W., SAHL, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.**, 24: 1551–1557, 2006.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **The Journal of cell biology**, v. 97, n. 2, p. 329-339, 1983.

HEDLUND, M.; NAGAEVA, O.; KARGL, D.; BARANOV, V.; MINCHEVA-NILSSON, L. Thermal-and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e16899, 2011.

HEIJNEN, H. F., SCHIEL, A. E., FIJNHEER, R., GEUZE, H. J., SIXMA, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alphanagranules. **Blood**, 94:3791–3799, 1999.

HRISTOV, M., ERL, W., LINDER, S., WEBER, P. C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, 104:2761–2766, 2004.

HSU, D. H. *et al.* Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides. **J. Immunother.**, 26, 440–450, 2003.

HSU, C., MOROHASHI, Y., YOSHIMURA, S., MANRIQUE-HOYOS, N., JUNG, S., LAUTERBACH, M. A., BAKHTI, M., GRØNBORG, M., MOBIUS, W., RHEE, J., *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. **J Cell Biol**, 189:223–232, 2010.

IRMAK MK, OZTAS Y, OZTAS E. Integration of maternal genome into the neonate genome through breast milk mRNA transcripts and reverse transcriptase. **Theor Biol Med Model.**, Jan; 9:20, 2012.

JANSSEN, E. M., LEMMENS, E. E., WOLF, E. T., CHRISTEN, U., VON HERRATH, M. G., SCHOENBERGER, S. P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **Nature**, 421:852–6, 2003.

JANSEN, F., NICKENIG, G., WERNER, N. Extracellular vesicles in cardiovascular disease. **Circ. Res.**, 120:1649–1657, 2017.

JAYACHANDRAN, M., MILLER, V. M., HEIT, J. A., *et al.* Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. **J Immunol Methods.**, Jan 31;375(1-2):207–14, 2012.

JONGBLOED, S. L., KASSIANOS, A. J., MCDONALD, K. J., CLARK, G. J., JU, X., ANGEL, C. E., CHEN, C. J., DUNBAR, P. R., WADLEY, R. B., JEET, V., *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. **J Exp Med.**;207(6):1247–1260, 2010.

KAHLENBERG, J. M., CARMONA-RIVERA, C., SMITH, C. K., KAPLAN, M. J. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. **J. Immunol.**, 190: 1217–1226, 2013.

KALRA, H., SIMPSON, R. J., JI, H., AIKAWA, E., ALTEVOGT, P., ASKENASE, P., *et al.* Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol**, v. 10, n. 12, p. e1001450, 2012.

KANDLER, K., SHAYKHIEV, R., KLEEMANN, P., KLESCZ, F., LOHOFF, M., VOGELMEIER, C., BALS R. The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. **Int. Immunol.**, 18:1729–1736, 2006.

KANG, H. K., LEE, H. Y., KIM, M. K., PARK, K. S., PARK, Y. M., KWAK, J. Y., BAE, Y. S. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met inhibits human monocyte-derived dendritic cell maturation via formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 2. **J. Immunol.**, 175: 685–692, 2005.

KANNO, T., YAMADA, T., IWABUKI, H., TANAKA, H., KURODA, S., TANIZAWA, K., AND KAWAI, T. Size distribution measurement of vesicles by atomic force microscopy. **Anal Biochem** 309:196 –199, 2002.

KANTOFF, P. W., HIGANO, C. S., SHORE, N. D., BERGER, E. R., SMALL, E. J., PENSON, D. F., REDFERN, C. H., FERRARI, A. C., DREICER, R., SIMS, R. B., *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **N Engl J Med.**, 363(5):411–422, 2010.

KEERTHIKUMAR, S., GANGODA, L., LIEM, M., *et al.* Progeogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. **Oncotarget.**, 6(17):15375-15396, 2015.

KELLER, S., SANDERSON, M. P., STOECK, A., AND ALTEVOGT, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett** 107:102–108, 2006.

KELLER, S.; RUPP, C.; STOECK, A.; RUNZ, S.; FOGEL, M.; LUGERT, S.; HAGER, H.; ABDEL-BAKKY, M.; GUTWEIN, P.; ALTEVOGT, P. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney international**, v. 72, n. 9, p. 1095-1102, 2007.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26:239 –257, 1972.

KIM, D. K.; KANG, B.; KIM, O. Y.; CHOI, D. S.; LEE, J.; KIM, S. R.; GO, G.; YOON, Y. J.; KIM, J. H.; JANG, S. C.; PARK, K. S.; CHOI, E. J.; KIM, K. P.; DESIDERIO, D. M.; KIM, Y. K.; LOTVALL, J.; HWANG, D.; GHO, Y. S. EVpedia: an integrated database of high- throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013.

KIM, S. H., *et al.* Exosomes derived from IL-10- treated dendritic cells can suppress inflammation collagen-induced arthritis. **J. Immunol.**, 174(10):6440–6448, 2005.

KIM, S. H., Bianco, N. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., Robbins, P. D. Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendritic cells genetically modified to express IL-4. **J. Immunol.**, 179(4):2242–2249, 2007.

KIM, S. H., *et al.* Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. **Mol. Ther.**, 13(2):289–300, 2006.

KOCZULLA, R., VON DEGENFELD, G., KUPATT, C., *et al.* An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **J Clin Invest.**, 111(11):1665–1672, 2003.

KOZAK, D. *et al.* Simultaneous size and zeta-potential measurements of individual nanoparticles in dispersion using size-tunable pore sensors. **ACS nano.**, 6, 6990-6997, 2012.

KOWAL, J.; ARRAS, G.; COLOMBO, M.; JOUVE, M.; MORATH, J. P.; PRIMDAL-BENGTSON, B.; DINGLI, F.; LOEW, D.; TKACH, M.; THÉRY, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle



subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. E968-E977, 2016.

ZUGHAIER, S. M.; SHAFER, W. M.; STEPHENS, D. S. Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1251-62, Sep 2005.

KSHIRSAGAR, S.; ALAM, S.; JASTI, S.; HODES, H.; NAUSER, T.; GILLIAM, M.; BILLSTRAND, C.; HUNT, J.; PETROFF, M. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 982-990, 2012.

KUKA, M., IANNAcone, M. The role of lymph node sinus macrophages in host defense. **Ann N Y Acad Sci**, 1319:38–46, 2014.

KUROSAKA, K., CHEN, Q., YAROVINSKY, F., OPPENHEIM, J. J., and YANG, D. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. **J. Immunol.**, 174, 6257–6265, 2005.

LAI, R. C.; ARSLAN, F.; LEE, M. M.; SZE, N. S. K.; CHOO, A.; CHEN, T. S.; SALTO-TELLEZ, M.; TIMMERS, L.; LEE, C. N.; EL OAKLEY, R. M. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem cell research**, v. 4, n. 3, p. 214-222, 2010.

LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187-197, 2011.

LANGENKAMP, A., MESSI, M., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nat. Immunol.**, 1:311, 2000.

LARRICK, J. W., HIRATA, M., BALINT, R. F., LEE, J., ZHONG, J., WRIGHT, S. C. Human CAPI8: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. **Infect. Immun.**, 63: 1291–1297, 1995.

LÄSSER, C.; ALIKHANI, V. S.; EKSTROM, K.; ELDH, M.; PAREDES, P. T.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; GABRIELSSON, S.; LÖTVALL, J.; VALADI, H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **J Transl Med**, v. 9, p. 9, 2011.

LÄSSER, C., ELDH, M., LÖTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing

exosomes. **J Vis Exp.**, (59):e3037, 2012.

LAULAGNIER K, MOTTA C, HAMDI S, *et al.* Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. **Biochem J.**, May 15;380(Pt 1):161–71, 2004.

LAULAGNIER, K., VINCENT-SCHNEIDER, H., HAMDI, S. *et al.* Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. **Blood Cells Mol Dis.**, 35(2):116-121, 2005.

LE PECQ, J.B. Dexosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside. **Blood Cells Mol Dis** 35:129 –135, 2005.

LE, Y., MURPHY, P. M., and WANG, J. M. Formyl-peptide receptors revisited. **Trends Immunol.**, 23, 541–548, 2002.

LEE, M. T.; CHEN, F. Y.; HUANG, H. W. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. **Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 3590-9, Mar 30 2004.

LEE, E. Y.; CHOI, D. Y.; KIM, D. K.; KIM, J. W.; PARK, J. O.; KIM, S.; KIM, S. H.; DESIDERIO, D. M.; KIM, Y. K.; KIM, K. P. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5425-5436, 2009.

LEVY, B. D., DE SANCTIS, G. T., DEVCHAND, P. R., KIM, E., ACKERMAN, K., SCHMIDT, B. A., SZCZEKLIK, W., DRAZEN, J. M., SERHAN, C. N. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). **Nat. Med.**, 8, 1018–1023, 2002.

LI, Z.; CLARKE, A. J.; BEVERIDGE, T. J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5478-5483, 1998.

LIU, Q., ROJAS-CANALES, D. M., DIVITO, S. J., SHUFESKY, W. J., STOLZ, D. B., ERDOS, G., SULLIVAN, M. L., GIBSON, G. A., WATKINS, S. C., LARREGINA, A. T., MORELLI, A. E. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. **J Clin Invest.**, 126(8):2805-20, 2016.

LLORENTE, A., SKOTLAND, T. SYLVANNE, T. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, 1831(7):1302-1309, 2013.

LOBB, R. J., BECKER, M., WEN, S. W., WONG, C. S. F., WIGMANS, A., LEIMGRUBER, A., MOLLER, A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **J. Ext. Ves.** 4:27031, doi10.3402/jev. v4.27031, 2015.

LOPEZ-ABARRATEGUI, C.; ALBA, A.; SILVA, O. N.; REYES-ACOSTA, O.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T.; MIGLIOLO, L.; COSTA, M. P.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R.; GARAY, H. E.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; OTERO-GONZALEZ, A. J. Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. **Biochimie**, v. 94, n. 4, p. 968-74, Apr 2012.

LÓPEZ-GARCIA, B.; LEE, P. H.; YAMASAKI, K.; GALLO, R. L. Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 1, p. 108-15, Jul 2005.

LÖTVALL, J.; HILL, A. F.; HOCHBERG, F.; BUZÁS, E. I.; DI VIZIO, D.; GARDINER, C.; GHO, Y. S.; KUROCHKIN, I. V.; MATHIVANAN, S.; QUESENBERRY, P. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 3, Jan;3: 26913, 2014.

LUKACS-KORNEK, V., ENGEL, D., TACKE, F., and KURTS, C. The role of chemokines and their receptors in dendritic cell biology. **Front. Biosci.**, 13, 2238–2252, 2008.

LUTZ, M. B., KUKUTSCH, N., OGILVIE, A. L., RÖSSNER, S., KOCH, F., ROMANI, N., SCHULER, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J Immunol Methods**, 223(1):77-92,1999.

MA, R.; BULLOCK, E.; MAYNARD, P.; REEDY, B.; SHIMMON, R.; LENNARD, C.; ROUX, C.; MCDONAGH, A. Fingerprint detection on non-porous and semi-porous surfaces using NaYF<sub>4</sub>: Er, Yb up-converter particles. **Forensic science international**, v. 207, n. 1-3, p. 145-9, Apr 15 2011.

MAAS, S. L. N., VRIJ, J. D., BROEKMAN, M. L. D. Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using Tunable Resistive Pulse Sensing. **J. Vis. Exp.** 92: e51623, doi:10.3791/51623, 2014.

MAIZELS, R. M.; HEWITSON, J. P.; MURRAY, J.; HARCUS, Y. M.; DAYER, B.; FILBEY, K. J.; GRAINGER, J. R.; MCSORLEY, H. J.; REYNOLDS, L. A.; SMITH, K. A. Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 1, p. 76-89, 2012.

MALLEGOL, J., *et al.* T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. **Gastroenterology**, 132(5):1866–1876, 2007.

MANNO S, TAKAKUWA Y, MOHANDAS N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions

modulate membrane stability. **Proc Natl Acad Sci.** Feb 5;99(4):1943–8, 2002.

MARSH, M., VAN MEER, G. Cell biology. No ESCRTs for exosomes. **Science**, 319:1191–1192, 2008.

MARTINEZ DE LIZARRONDO, S., RONCAL, C., CALVAYRAC, O., *et al.* Synergistic effect of thrombin and CD40 ligand on endothelial matrix metalloproteinase-10 expression and microparticle generation in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 32(6):1477-1487, 2012.

MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. **Trends Immunol** 33:66–70, 2012.

MARZESCO, A. M., JANICH, P., WILSCH-BRAUNINGER, M., DUBREUIL, V., LANGENFELD, K., CORBEIL, D., AND HUTTNER, W. B. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. **J Cell Sci**, 118:2849 –2858, 2005.

MASON, J. M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. **Future medicinal chemistry**, v. 2, n. 12, p. 1813-22, Dec 2010.

MATHIVANAN, S., SIMPSON, R. J. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. **Proteomics**, v. 9, n. 21, p. 4997-5000, Nov 2009.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-20, Sep 10 2010.

MCDONALD, M. K., TIAN, Y., QURESHI, R. A., GORMLEY, M., ERTEL, A., GAO, R., ARADILLAS LOPEZ, E., ALEXANDER, G. M., SACAN, A., FORTINA, P., AJIT, S. K. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. **Pain**, 155(8):1527-39, 2014.

MEZOUAR, S., DAROUSSET, R., DIGNAT-GEORGE, F., *et al.* Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. **Int. J. Cancer**, 136(2):462-475, 2015.

MINCIACCHI, V. R., YOU, S., SPINELLI, C., *et al.* Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. **Oncotarget**, 6(13):11327-11341, 2015.

MITTELBRUNN, M.; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; VILLARROYA-BELTRI, C.; GONZÁLEZ, S.; SÁNCHEZ-CABO, F.; GONZÁLEZ, M. Á.; BERNAD, A.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature communications**, v. 2, p. 282, 2011.

MIKSA, M., WU, R., DONG, W., DAS, P., YANG, D., WANG, P. Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. **Shock**; 25: 586-93, 2006.

MIKSA, M., WU, R., DONG, W., *et al.* Immature dendritic cell-derived exosomes rescue septic animals via milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII [corrected]. **J Immunol**; 183: 5983-90, 2009.

MOBIUS, W., VAN DONSELAAR, E., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y. HEIJNEN, H. F., SLOT, J. W., GEUZE, H. J. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. **Traffic**, Apr; 4(4):222-231. 2003.

MONTECALVO, A.; LARREGINA, A. T.; SHUFESKY, W. J.; STOLZ, D. B.; SULLIVAN, M. L.; KARLSSON, J. M.; BATY, C. J.; GIBSON, G. A.; ERDOS, G.; WANG, Z. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 756-766, 2012.

MONTECALVO, A., SHUFESKY, W. J., STOLZ, D. B., SULLIVAN, M. G., WANG, Z., DIVITO, S. J., PAPWORTH, G. D., *et al.* Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. **J Immunol.**, 180(5):3081-90, 2008.

MOOKHERJEE, N.; BROWN, K. L.; BOWDISH, D. M.; DORIA, S.; FALSAFI, R.; HOKAMP, K.; ROCHE, F. M.; MU, R.; DOHO, G. H.; PISTOLIC, J.; POWERS, J. P.; BRYAN, J.; BRINKMAN, F. S.; HANCOCK, R. E. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2455-64, Feb 15 2006.

MOOKHERJEE, N., LIPPERT, D. N. D., HAMILL, P., FALSAFI, R., NIJNIK, A., KINDRACHUK, J., PISTOLIC, J., GARDY, J., MIRI, P., NASEER, M., *et al.* Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes. **J. Immunol.**, 183:2688–2696, 2009.

MORELLI, A. E., LARREGINA, A. T., SHUFESKY, W. J., *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**, 104(10):3257-66, 2004.

MORIMOTO, C., LETVIN, N. L., DISTASO, J. A., ALDRICH, W. R., SCHLOSSMAN, S.

F. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. **J Immunol.**, 134(3):1508-15, 1985.

MOSCARDI-BACCHI, M., BRUMMER, E., STEVENS, D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J Med Microbiol.**, 40(3):159-64, 1994.

MULCAHY, L. A., PINK, R. C., CARTER, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **J Extracell vesicles**, Jan;3, 2014.

MUNTASELL, A., BERGER, A. C., ROCHE, P. A. T cell induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. **EMBO J.**, 26(19):4263–4272, 2007.

MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J. W., SEDGWICK, A., *et al.* Microvesicles; mediators of extracellular communication during cancer progression. **J. Cell Sci.**, 123(Pt 10):1603-1611, 2010.

MURPHY, J., KIES, M. Note on the spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. **Biochimica et biophysica acta**, 3:382–384, 1960

NABHAN, J. F., HU, R., OH, R. S., COHEN, S. N., LU, Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109, pp. 4146-4151, 2012.

NASCIMENTO, F. R., CALICH, V. L., RODRIGUEZ, D., RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, 168:4593-4600, 2002.

NELL, M., TJABRINGA, G. S., WAFELMAN, A. R., WERRIJK, R., HIEMSTRA, P. S., DRIJFHOUT, J. W., GROTE, J. J. Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. **Peptides**, 27(4): 649-660, 2006.

NIEUWLAND, R., BERCKMANS, R. J., ROTTEVEEL-EIJKMAN, R. C., MAQUELIN, K. N., ROOZENDAAL, K. J., JANSEN, P. G., TEN HAVE, K., EIJSMA, L., HACK, C. E., AND STURK, A. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. **Circulation**, 96:3534 –3541, 1997.

NIJNIK, A.; PISTOLIC, J.; WYATT, A.; TAM, S.; HANCOCK, R. E. Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs. **J Immunol**, v. 183, n. 9, p. 5788-98, Nov 1 2009.

NIYONSABA, F., IWABUCHI, K., SOMEYA, A., HIRATA, M., MATSUDA, H., OGAWA, H., NAGAOKA, I. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. **Immunology**, 106(1):20-6, 2002.

NOLTE-T HOEN, E. N. M., BUERMANS, H. P., WAASDORP, M., *et al.* Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Res.**, 40(18):9272-9285, 2012.

NOLTE-T HOEN, E. N., BUSCHOW, S. I., ANDERTON, S. M., STOORVOGEL, W., WAUBEN, M. H. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. **Blood**, 113: 1977-81, 2009.

NOLTE-T HOEN, E. N. M.; and WAUBEN, M. H. M. Immune cell-derived vesicles: modulators and mediators of inflammation. **Curr. Pharm. Des.**, 18:2357-2368, 2012.

OLIVEIRA, D. L.; NAKAYASU, E. S.; JOFFE, L. S.; GUIMARÃES, A. J.; SOBREIRA, T.; NOSANCHUK, J. D.; CORDERO, R.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11113, 2010.

ONG, P. Y., OHTAKE, T., BRANDT, C., STRICKLAND, I., BOGUNIEWICZ, M., GANZ, T., GALLO, R. L., LEUNG, D. Y. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. **N. Engl. J. Med.**, 347: 1151–1160, 2002.

OPPENHEIM, J. J., BIRAGYN, A., KWAK, L. W., YANG, D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. **Ann. Rheum. Dis.**, 62:ii17–ii21, 2003.

OSTMAN, S., TAUBE, M., TELEMO, E. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. **Immunology**. Dec;116(4):464–76, 2005.

PALADE, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. **Science**. Sep 12;189(4206):867, 1975.

PALANISAMY, V.; SHARMA, S.; DESHPANDE, A.; ZHOU, H.; GIMZEWSKI, J.; WONG, D. T. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8577, 2010.

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967-978,

1983.

PAN, B. T., TENG, K., WU, C., *et al.* Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. **J Cell Biol.**, Sep;101(3):942–8, 1985.

PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13368-13373, 2004.

PLUSKOTA, E., WOODY, N. M., SZPAK, D., *et al.* Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. **Blood**, 112(6):2327-2335, 2008.

POWERS, J. P., HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24:1681–1691, 2003.

QAZI, K. R.; PAREDES, P. T.; DAHLBERG, B.; GRUNEWALD, J.; EKLUND, A.; GABRIELSSON, S. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. **Thorax**, v. 65, n. 11, p. 1016-1024, 2010.

RAIMONDO, F., MOROSI, L., CHINELLO, C., *et al.* Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. **Proteomics**. 11(4):709-720, 2011.

RANA, S., YUE, S., STADEL, D., *et al.* Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. **Int J Biochem Cell Biol.**, Sep;44(9):1574–84, 2012.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, W.; LIEJENDEKKER, R.; HARDING, C. V.; MELIEF, C.; GEUZE, H. J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161-1172, 1996.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-83, Feb 18 2013.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America**, Leukemia Research Fund, U.K, v. 20, n. 9, p. 1487-95, Sep, 2006.

RECORD, M., SUBRA, C., SILVENTE-POIROT, S., and POIROT, M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. **Biochem Pharmacol**, 81:1171–



1182, 2011.

ROBBINS, P. D., MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, 14:195–208, 2014.

ROBBINS, S. H., WALZER, T., DEMBELE, D., THIBAUT, C., DEFAYS, A., BESSOU, G., XU, H., VIVIER, E., SELLARS, M., PIERRE, P, *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. **Genome Biol.**; 9(1): R17, 2008.

ROBERTS, E. W., BROZ, M. L., BINNEWIES, M., HEADLEY, M. B., NELSON, A. E., WOLF, D. M., KAISHO, T., BOGUNOVIC, D., BHARDWAJ, N., KRUMMEL, M. F. Critical role for CD103(+)/CD141(+) dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell ONCOIMMUNOLOGY e1608106-15 immunity in melanoma. **Cancer Cell**, 30(2):324–336, 2016.

ROBERTS, G. S., KOZAK, D., ANDERSON, W., *et al.* Tunable nano/micropores for particle detection and discrimination: scanning ion occlusion spectroscopy. **Small**, Dec 6;6(23):2653–8, 2010.

ROBERTS, G. S. *et al.* Tunable pores for measuring concentrations of synthetic and biological nanoparticle dispersions. **Biosensor. & bioelectronics.**, 31, 17-25, 2012.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RONQUIST G. Prostatomes: Their Characterization: Implications for Human Reproduction: Prostatomes and Human Reproduction. **Adv Exp Med Biol**. Jan; 868:191–209, 2015.

ROOD, I. M., DEEGENS, J. K., MERCHANT, M. L., TAMBOER, W. P., WILKEY, D. W., WETZELS, J. F., AND KLEIN, J. B. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. **Kidney Int** 78:810 – 816, 2010.

ROSENFELD, Y., PAPO, N., SHAI, Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. **J. Biol. Chem.**, 281: 1636–1643, 2006.

ROTHMAN, J. E. Lasker Basic Medical Research Award. The machinery and principles of vesicle transport in the cell. **Nat Med**. Oct;8(10):1059–62, 2002.

SABADO, R. L., BHARDWAJ, N. Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move. **Nature.**, 519(7543):300-1, 2015.

SAID, A., WEINDL, G. Regulation of dendritic cell function in inflammation. **J. Immunol. Res.**, 2015:743169, 2015.

SALMON, H., IDOYAGA, J., RAHMAN, A., LEBOEUF, M., REMARK, R., JORDAN, S., CASANOVA-ACEBES, M., KHUDOYNAZAROVA, M., AGUDO, J., TUNG, N., *et al.* Expansion and activation of CD103 + dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition. **Immunity**, 44(4):924–938, 2016.

SANDGREN, S.; WITTRUP, A.; CHENG, F.; JONSSON, M.; EKLUND, E.; BUSCH, S.; BELTING, M. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17951-6, Apr 23, 2004.

SATHE, P., POOLEY, J., VREMEC, D., MINTER, J., JIN, J. O., WU, L., KWAK, J. Y., VILLADANGOS, J. A., SHORTMAN, K. The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. **J Immunol.**;186(9):5184–5192, 2011.

SAVINA, A., FADER, C. M., DAMIANI, M. T., COLOMBO, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**, 6:131–143, 2005.

SAXENA, M., BALAN, S., ROUDKO, V., BHARDWAJ, N. Towards superior dendritic-cell vaccines for cancer therapy. **Nat Biomed Eng.**; 2(6):341–346, 2018.

SCHALLER-BALS, S., SCHULZE, A., BALS, R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 165: 992–995, 2002.

SCHIERER, S., OSTALECKI, C., ZINSER, E., *et al.* Extracellular vesicles from mature dendritic cells (DC) differentiate monocytes into immature DC. **Life Sci Alliance.**, (6):e201800093, 2018.

SCHILLER, M.; BEKEREDJIAN-DING, I.; HEYDER, P.; BLANK, N.; HO, A.; LORENZ, H. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 183-191, 2008.

SCHMIDT, J. R., KLIEMT, S., PREISLER, C., *et al.* Osteoblast-released matrix vesicles - regulation of activity and composition by sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans.

**Mol Cell Proteomics.** Nov 23, 2015.

SCHREIBELT, G., BOL, K. F., WESTDORP, H., WIMMERS, F., AARNTZEN, E. H., DUIVEMAN-DE BOER, T., VAN DE RAKT, M. W., SCHARENBERG, N. M., DE BOER, A. J., POTS, J. M., *et al.* Effective clinical responses in metastatic melanoma patients after vaccination with primary myeloid dendritic cells. **Clin Cancer Res.**; 22(9):2155–2166, 2016.

SCOTT, M. G., DAVIDSON, D. J., GOLD, M. R., BOWDISH, D., HANCOCK, R. E. W. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **J. Immunol.**, 169: 3883–3891. 2002.

SEGURA, E., AMIGORENA, S., THERY, C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. **Blood Cells Mol Dis**, 2005; 35: 89-93, 2005.

SEGURA, E., GUÉRIN, C., HOGG, N., AMIGORENA, S., THÉRY, C. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes *in vivo*. **J Immunol.**, 179(3):1489-96, 2007.

SEIGNEURET, M., ZACHOWSKI, A., HERMANN, A., *et al.* Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. **Biochemistry.** Sep 11;23(19):4271–5, 1984.

SHAH, M. D., BERGERON, A. L., DONG, J-F., *et al.* Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. **Platelets**, Aug;19(5):365–72, 2008.

SHEDLOCK, D. J., SHEN, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. **Science**, 300:337–9, 2003.

SHIN, T-S., KIM, J. H., KIM, Y-S., JEON, S. G., ZHU, Z., GHO, Y. S., KIM, Y-K. Extracellular vesicles are key intercellular mediators in the development of immune dysfunction to allergens in the airways. **Allergy**, 65:1256–1265, 2010.

SICA, A., ERRENI, M., ALLAVENA, P., PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cell Mol Life Sci**, 72:4111–4126, 2015.

SIEDLECKI, C. A., WANG, I. W., HIGASHI, J. M., KOTTKE-MARCHANT, K., AND MARCHANT, R. E. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. **Biomaterials** 20:1521–1529, 1999.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. **Curr Opin Cell Biol** 21:575–581, 2009.

SINGH, D., QI, R., JORDAN, J. L., SAN MATEO, L., KAO, C. C. The human antimicrobial peptide LL-37, but not the mouse ortholog, mCRAMP, can stimulate signaling by poly(I:C) through a FPRL1-dependent pathway. **J Biol Chem.**, 288(12):8258–8268, 2013.

SINGH, P. P., SMITH, V. L., KARAKOUSIS, P. C., SCHOREY, J. S. Exosomes isolated from mycobacteria-infected mice or cultured macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. **J Immunol**, 189:777–785, 2012.

SIQUEIRA, I. M., FRAGA, C. L., AMARAL, A. C., SOUZA, A. C., JERÔNIMO, M. S., CORREA, J. R., MAGALHÃES, K. G., INÁCIO, C. A., RIBEIRO, A. M., BURGUEL, P. H., FELIPE, M. S., TAVARES, A. H., BOCCA, A. L. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Med Mycol.**, 54(2):177-88, 2016.

SKOKOS, D., BOTROS, H. G., DEMEURE, C., MORIN, J., PERONET, R., BIRKENMEIER, G., BOUDALY, S., MÉCHERI, S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses *in vivo*. **J Immunol.**, 170(6):3037-45, 2003.

SOEHNLEIN, O., ZERNECKE, A., ERIKSSON, E. E., ROTHFUCHS, A. G., PHAM, C. T., HERWALD, H., BIDZHEKOV, K., ROTTENBERG, M. E., WEBER, C., LINDBOM, L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. **Blood**, 112: 1461–1471, 2008.

SZABO, S. J., SULLIVAN, B. M., STEMMANN, C., SATOSKAR, A. R., SLECKMAN, B. P., GLIMCHER, L. H. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- $\gamma$  production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, 295:338–42, 2002.

TAAMS, L. S., VAN RENSEN, A. J., POELEN, M. C., *et al.* Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. **Eur J Immunol**; 28: 2902-12, 1998.

TAVARES, A. H., SILVA, S. S., DANTAS, A., CAMPOS, E. G., ANDRADE, R. V., MARANHÃO, A. Q., BRÍGIDO, M. M., PASSOS-SILVA, D. G., FACHIN, A. L., TEIXEIRA, S. M., PASSOS, G. A., SOARES, C. M., BOCCA, A. L., CARVALHO, M. J., SILVA-PEREIRA, I., FELIPE, M. S. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect.*, Apr;9(5):583-90, 2007.

TAVARES, A. H., DERENGOWSKI, L. S., FERREIRA, K. S., SILVA, S. S., MACEDO,

C., BOCCA, A. L., PASSOS, G. A., ALMEIDA, S. R., SILVA-PEREIRA, I. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS Negl Trop Dis.**, 6(1):e1459, 2012.

TAVARES, A. H., *et al.* NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 5 dez., 2013.

TEIXEIRA, L. K., FONSECA, B. P., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOZA, B. A., ROBBS, B. K., BOZZA, P. T., *et al.* IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation. **J Immunol.**, 175:5931–9, 2005.

THÉRY, C., BOUSSAC, M., VÉRON, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., GARIN, J., AMIGORENA, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **J Immunol**, 166: 7309 – 7318, 2001.

THÉRY, C.; DUBAN, L.; SEGURA, E.; VÉRON, P.; LANTZ, O.; AMIGORENA, S. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. **Nature immunology**, v. 3, n. 12, p. 1156-1162, 2002.

THÉRY, C., OSTROWSKI, M., SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, 9:581–593, 2009.

THÉRY, C., REGNAULT, A., GARIN, J., WOLFERS, J., ZITVOGEL, L. CASTAGNOLI-RICCIARDI, P., RAPOSO, G. AMIGORENA, S. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: selective accumulation of the heat shock protein hsc73. **The J. Cell Biol.**, 147(3), Nov 1:599-610, 1999.

THOMSON, A. W., ROBBINS, P. D. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. **Ann Rheum Dis.**, 67(suppl 3): iii90–iii96, 2008.

TICKNER, J. A., URQUHART, A. J., STEPHENSON, S-A., RICHARD, D. J., O'BYRNE, K. J. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. **Front. Oncol.**, 4:127, 2014.

TJABRINGA, G. S.; AARBIOU, J.; NINABER, D. K.; DRIJFHOUT, J. W.; SORENSEN, O. E.; BORREGAARD, N.; RABE, K. F.; HIEMSTRA, P. S. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6690-6, Dec 15, 2003.

TJABRINGA, G. S., D. K. NINABER, J. W. DRIJFHOUT, K. F. RABE, AND P. S. HIEMSTRA. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 140: 103–112, 2006.

TKACH, M., THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1226-1232, 2016.

TKACH, M., KOWAL, J., ZUCCHETTI, A. E., ENSERINK, L., JOUVE, M., LANKAR, D., SAITAKIS, M., MARTIN-JAULAR, L., THÉRY, C. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. **EMBO J.**, 36(20):3012-3028, 2017.

TOMASINSIG, L., ZANETTI, M. The cathelicidins: structure, function and evolution. **Curr. Protein Pept. Sci.**, 6, 23–34, 2005.

TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRUGGER, B., SIMONS, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. **Science**, 319:1244 –1247, 2008.

TRAVIS, S. M.; ANDERSON, N. N.; FORSYTH, W. R.; ESPIRITU, C.; CONWAY, B. D.; GREENBERG, E. P.; MCCRAY, P. B., JR.; LEHRER, R. I.; WELSH, M. J.; TACK, B. F. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 2748-55, May 2000.

TUCHER, C., KONRAD, B., SCHILLER, P., CLABEN, L., BIRR, C., SOUTO-CARNEIRO, M. M., BLANK, N., LORENZ, H-M., SCHILLER, M. Extracellular Vesicle Subtypes Released from Activated or Apoptotic T-Lymphocytes Carry a Specific and Stimulus-Dependent Protein Cargo. **Front. Immunol.**, 9:534, 15 March 2018.

TURIÁK, L., MISJÁK, P., SZABÓ, T. G., ARADI, B., PÁLÓCZI, K., OZOHANICS, O., DRAHOS, L., KITTEL, A., FALUS, A., BUZÁS, E. I., *et al.* Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. **J Proteomics**, 74:2025–2033, 2011.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 654-9, 2007.

VAN DEN BOORN, J. G. DASSLER, J., COCH, C., *et al.* Exosomes as nucleic acid nanocarriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 65(3):331-335, 2013.

VAN DER DOES, A. M., H., BEEKHUIZEN, B., RAVENSBERGEN, T., VOS, T. H. M., OTTENHOFF, J. T., VAN DISSEL, J. W., DRIJFHOUT, P. S., HIEMSTRA, P. H. NIBBERING. LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature. **J. Immunol.**, 185: 1442–1449, 2010.

VAN DER POL, E., BÖING, A. N., HARRISON, P., STURK, A., & NIEUWLAND, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, 64(3), 676–705, 2012.

VAN DER POL, E., BÖING, A. N., GOOL, E. L., *et al.* Recent developments on the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. **J. Thromb Haemost.** Nov 12;14(1):48–56, 2015.

VAN DER POL, E., HOEKSTRA, A. G., STURK, A., OTTO, C., VAN LEEUWEN, T. G., NIEUWLAND, R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. **J Thromb Haemost.**, 8:2596 –2607, 2010.

VANDAMME, D.; LANDUYT, B.; LUYTEN, W.; SCHOOF, L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. **Cellular immunology**, v. 280, n. 1, p. 22-35, Nov 2012.

VELLA, L. J., GREENWOOD, D. L., CAPPAL, R., SCHEERLINCK, J. P., AND HILL, A. F. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. **Vet Immunol Immunopathol** 124:385–393, 2008.

VILLADANGOS, J. A., SHORTMAN, K. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. **J Exp Med.**; 207 (6):1131–1134, 2010.

VOGEL, R. *et al.* Quantitative sizing of nano/microparticles with a tunable elastomeric pore sensor. **Analytical chemistry.**, 83, 3499-3506, 2011.

WAN, M., SABIRSH, A., WETTERHOLM, A., AGERBERTH, B., HAEGGSTRÖM, J. Z. Leukotriene B4 triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils. Novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. **FASEB J.**, 21, 2897–2905, 2007.

WANG, Q., LU, Q. Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling. **Nature Communications**, 8, p. 709, 2017.

WEBBER, A. J., JOHNSON, S. A. Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis. **Am J Pathol.**; 60:19–42, 1970.

WEISS, R., EICHHORN, T., SPITTLER, A., *et al.* Release and cellular origin of extracellular vesicles during circulation of whole blood over adsorbent polymers for lipid apheresis. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, Dec 16; 2015.

WEN, C., SEEGER, R. C., FABBRI, M., WANG, L., WAYNE, A. S., JONG, A. Y. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, vol. 6, 1400370, 2017.

WHITE, I. J., BAILEY, L. M., AGHAKHANI, M. R., MOSS, S. E., FUTTER, C. E. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. **EMBO J**, 25:1–12, 2006.

WILLMOTT, G. R. *et al.* Use of tunable nanopore blockade rates to investigate colloidal dispersions. *Journal of physics. Condensed matter: An Institute of Physics journal.* **22**, 454116, 2010.

WITWER, K. W., BUZÁS, E. I., BEMIS, L. T., BORA, A., LÄSSER, C., LÖTVALL, J., NOLTE-T HOEN, E. N., PIPER, M. G., SIVARAMAN, S., SKOG, J., THÉRY, C., WAUBEN, M. H., HOCHBERG, F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **J Extracell Vesicles**, May 27;2. doi: 10.3402/jev. v2i0.20360. eCollection 2013.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol.**, May;13(3):269–88, 1967.

WUBBOLTS R, LECKIE RS, VEENHUIZEN PTM, *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. **J Biol Chem.**, Mar 28;278(13):10963–72, 2003.

WÜTHRICH, M., DEEPE JR., G. S., KLEIN, B. Adaptive Immunity to Fungi. **Annu Rev Immunol.**, 30: 115–148, 2012.

YANG, L.; WEISS, T. M.; LEHRER, R. I.; HUANG, H. W. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. **Biophysical journal**, v. 79, n. 4, p. 2002-9, Oct 2000.

YANG, D.; CHEN, Q.; SCHMIDT, A. P.; ANDERSON, G. M.; WANG, J. M.; WOOTERS, J.; OPPENHEIM, J. J.; CHERTOV, O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1069-74, Oct 2, 2000.



YE, R. D., BOULAY, F., WANG, J. M., DAHLGREN, C., GERARD, C., PARMENTIER, M., SERHAN, C. N., and MURPHY, P. M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol. Rev.**, 61, 119–161, 2009.

YU, J., MOOKHERJEE, N., WEE, K., BOWDISH, D. M., PISTOLIC, J., LI, Y., REHAUME, L., HANCOCK, R. E. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1b, augments immune responses by multiple pathways. **J. Immunol.**, 179: 7684–7691, 2007.

YUANA, Y., BERTINA, R. M., and OSANTO, S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. **Thromb Haemost** 105:396 – 408, 2011.

YUANA, Y., OOSTERKAMP, T. H., BAHATYROVA, S., ASHCROFT, B., GARCIA RODRIGUEZ, P., BERTINA, R. M., AND OSANTO, S. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. **J Thromb Haemost** 8:315–323, 2010.

ZAKHAROVA L, SVETLOVA M, FOMINA AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. **Physiol**, Jul; 212(1):174–81, 2007.

ZANETTI, M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. **Curr. Issues Mol. Biol.**, 7: 179–196, 2005.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, 415: 389–395, 2002.

ZHANG, Z., CHERRYHOLMES, G., CHANG, F., ROSE, D. M., SCHRAUFSTATTER, I., SHIVELY, J. E. Evidence that cathelicidin peptide LL-37 may act as a functional ligand for CXCR2 on human neutrophils. **Eur. J. Immunol.**, 39: 3181–3194, 2009.

ZHANG, Y., LIU, F., YUAN, Y., JIN, C., CHANG, C., ZHU, Y., ZHANG, X., TIAN, C., HE, F., WANG, J. Inflammasome-Derived Exosomes Activate NF- $\kappa$ B Signaling in Macrophages. **J Proteome Res.**, 16(1):170-178, 2017.

ZITVOGEL, L., REGNAULT, A., LOZIER, A., WOLFERS, J., FLAMENT, C., TENZA, D., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., AMIGORENA, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nat Med**, 4:594–600, 1998.

