

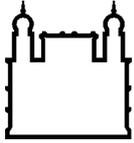
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE FIBRÓCITOS DO SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO COM *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO

Rio de Janeiro
Março de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO

Análise da interação de fibrócitos do sangue periférico humano com *Leishmania (L.) amazonensis*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dra. Suzana Côrte-Real Faria

RIO DE JANEIRO
Março de 2019

de Paula Pereira Pinto, Paolla Roberta.

Análise da interação de fibrócitos do sangue periférico humano com *Leishmania (L.) amazonensis* / Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto. - Rio de Janeiro, 2019.

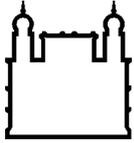
xvi, 82f. f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Suzana Côrte-Real Faria.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Fibrócito. 2. *Leishmania (L.) amazonensis*. 3. Interação parasito-célula. 4. Imunologia . 5. Microscopia Eletrônica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE FIBRÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO
HUMANO COM *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS***

ORIENTADOR: Prof. Dra. Suzana Côrte-Real Faria

Aprovada em: 19/03/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro - Presidente (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Katia da Silva Calabrese (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Dilvani Oliveira Santos (UFF)

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (UERJ)

Prof. Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 19 de março de 2019

A minha família e amigos pelo afeto e incentivo durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força e coragem durante toda a minha vida e, principalmente, por esse período. Por ter me escutado toda noite ao pedir e fazer diversas promessas para que este projeto desse certo - e deu - e, também, por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida com quem aprendi e pude contar para o término do mestrado.

À minha família, em especial meus pais, Marcia Ony e Roberto Ferreira, e minha vó Wilma Fernandes por cada palavra de incentivo e por sempre estarem ao meu lado, sem se importarem qual o momento e nem a distância. Meus irmãos Pablo Roberto, Slla, Lolla e Maya por todo apoio, sem vocês eu não seria ninguém e não teria conseguido.

Ao Bruno, meu noivo, que mesmo de longe se fez presente em todos os momentos, obrigada por toda vez que você veio ao Rio de Janeiro me oferecer ajuda e carona para ir a Fiocruz no final de semana. Obrigada por sempre me entender, me incentivar, sempre me fazer acreditar no meu potencial e por aguentar minhas crises existenciais.

À minha orientadora Dra. Suzana Côrte-Real, por todo conhecimento transmitido durante esses 6 anos (IC e Mestrado), por me ajudar em vários momentos de angústia e incerteza, por ser essa pessoa maravilhosa, calma, atenciosa e pela grande amizade que vou levar para a eternidade.

Ao Roger Macedo-Silva, por se tornar um co-orientador, mesmo não sendo esse seu papel, durante todo o meu percurso na Fiocruz, você sabe que sem você esse trabalho não iria para frente, até porque foi você que me fez gostar dos fibrócitos. Serei eternamente grata por cada palavra, por cada orientação, por todo conhecimento transmitido e pela grande amizade que contribuiu para que eu conseguisse finalizar esse trabalho.

À Dra. Roberta Olmo, que tanto me ajudou nas análises das citocinas e nunca me negou ajuda durante esse período. Obrigada por todo carinho e calma.

À Sandra Maria, Dra. Camila Guerra, Dr. Gilberto Silva, Dra. Rosa Pinho, Perielia Vasconcelos, Dra. Rhana Prata, Helen Ferreira, Dra. Tatiana Silva, Alanderson Nogueira, Rômulo Custódio, Dra. Andrea Henriques, Dra. Katia Calabrese por se disponibilizarem para me ajudar, desde a confecção da cultura, ajuda em técnicas, elaboração de resultados, manipulação de equipamentos e empréstimos de anticorpos, agradeço à vocês do fundo do meu coração.

Aos meus amigos e amigas que fiz fora e dentro da Fiocruz, Stella Oliveira, Rute Albuquerque, Nathalia Paes, Karina Souza, Liandra Alvarez, Barbara dos Santos Mariana Garcia, Paloma Vieira, Luiza Bendia, Lucas Garcia, Gabriel Henriques, Lucas Keidel, Luciana Saraiva, Ada Matos, Ludmila Gurjão e Juliana Peixoto por compartilharam a amizade, por cada lágrima, gargalhada, ajuda e incentivo para que sejamos sempre os melhores em todas as nossas escolhas.

À coordenação do Mestrado em Biologia Parasitária pelo auxílio e presteza, ao longo destes dois anos.

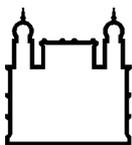
Aos professores do mestrado, pelo conhecimento transmitido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro durante todo o trabalho.

Ao Djavan, mesmo não conhecendo fisicamente, me ajudou com suas músicas durante toda cultura, infecção e análises dos resultados, me fez me sentir mais calma e esperançosa para que tudo desse certo.

E a todos, que mesmo não citados aqui, me ajudaram e incentivaram durante o percurso do mestrado.

“Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tem coragem para persegui-los - Walt Disney “



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

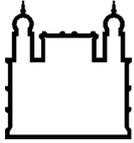
ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE FIBRÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO COM *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Mais de 200 países são endêmicos para esta doença, estimando-se que 350 milhões de pessoas estão em risco. A transmissão ocorre quando o inseto vetor regurgita parasitos na derme do hospedeiro mamífero. Células residentes e inflamatórias são atraídas para o local da infecção podendo ocorrer a endocitose e iniciar uma resposta imune frente ao parasito. Os fibrócitos são conhecidos como células hematopoiéticas que expressam proteína pan-leucocitária CD45 e produzem proteínas de matriz extracelular, por exemplo, o colágeno I. Estudos têm definido a participação dos fibrócitos em processos patológicos, sugerindo um papel central no reparo da lesão em doenças infecciosas. Análises da infecção *in vitro* com promastigotas de *L. amazonensis*, mostraram que os fibrócitos oriundos de camundongos BALB/c fagocitaram e debelaram a infecção após 72h de interação. No entanto, não existem estudos sobre o papel de fibrócitos humanos nas leishmanioses. Neste contexto, iniciamos as análises da interação *in vitro* de fibrócitos humanos utilizando promastigotas de *L. amazonensis* e para isso foi estabelecida a cultura primária e, a partir do 15º dia as culturas de fibrócitos foram infectadas e analisadas por diferentes técnicas. Para a caracterização fenotípica destas células, utilizamos a dupla marcação anti-CD45/HSP47 que se revelou uma excelente estratégia para a identificação dos fibrócitos humanos. A avaliação da interação mostrou que os fibrócitos reconhecem o parasito, através de análises ultraestruturais observamos que os fibrócitos emitem projeções citoplasmáticas que enrolaram os parasitos favorecendo a fagocitose. Após 15 dias de interação verificamos que este grupo celular é suscetível a infecção por *L. amazonensis*, pois observamos a diferenciação das promastigotas em amastigotas, bem como, a sua multiplicação no interior de vacúolos parasitóforos. As amastigotas foram capazes de romper as células e re-infectar outros fibrócitos. A partir das análises da produção dos mediadores químicos inflamatórios verificamos que os fibrócitos respondem a infecção com a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias durante os tempos estabelecidos neste estudo, tornando favoráveis as condições para o estabelecimento da infecção. Estes resultados nos permitem sugerir que os fibrócitos humanos podem servir como células hospedeiras na resposta inicial e no desenvolvimento da leishmaniose cutânea, pois parasitos do gênero *Leishmania* modulam a resposta dos fibrócitos humanos, se multiplica, rompe a célula, e é liberada para infectar outros tipos celulares ou o próprio fibrócito.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD FIBROCYTES INTERACTION WITH *LEISHMANIA* (*L.*) *AMAZONENSIS*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto

The Leishmaniasis is an infectious disease caused by an obligate intracellular protozoan of the genus *Leishmania*. More than 200 countries are endemic for this disease, with an estimated 350 million people at risk. The transmission occurs when the vector insect regurgitates parasites in the dermis of the mammalian host. Resident and inflammatory cells are attracted to the infection site, and endocytosis can occur and initiate an immune response to the parasite. Fibrocytes are known as hematopoietic cells that express CD45 pan-leukocyte protein and produce extracellular matrix proteins, for example, collagen I. Studies have defined the participation of fibrocytes in pathological processes, suggesting a central role in the repair of the lesion in infectious diseases. Analyses *in vitro* infection with *L. amazonensis* promastigotes, fibrocytes from BALB/c mice phagocytosed and infected the infection after 72h of interaction. However, there are no studies on the role of human fibrocytes in leishmaniasis. In this context, we began the analyses of the *in vitro* interaction of human fibrocytes using *L. amazonensis* promastigotes, and for this, the primary culture was established and, from the 15th day, the perceptions of fibrocytes were infected and analyzed by different techniques. For the phenotypic characterization of these cells, we used double anti-CD45 / HSP47 labelling which proved to be an excellent strategy for the identification of human fibrocytes. The evaluation of the interaction showed that the fibrocytes recognize the parasite, through ultrastructural analyses we observed that the fibrocytes emit cytoplasmic projections that rolled up the parasites favoring phagocytosis. After 15 days of interaction, we noted that this cell group is susceptible to infection by *L. amazonensis*, as we observed the differentiation of promastigotes into amastigotes, as well as their multiplication within parasitophorous vacuoles. The amastigotes were able to break down the cells and re-infect other fibrocytes. From the analysis of the production of the inflammatory chemical mediators, we verified that the fibrocytes respond to the infection with the production of pro and anti-inflammatory cytokines during the times established in this study, making favorable the conditions for the establishment of the infection. These results allow us to suggest that human fibrocytes may serve as host cells in the initial response and the development of cutaneous leishmaniasis because parasites of the *Leishmania* genus modulates the response of human fibrocytes, multiplies, breaks the cell, and is released to infect other types cells or the fibrocyte itself.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | x |
| Lista de Siglas e Abreviaturas | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | |
| 1.1 As Leishmanioses | 1 |
| 1.2 Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> | 6 |
| 1.3 Resposta celular frente à infecção por <i>Leishmania</i> | 7 |
| 1.4 Fibrócitos | 10 |
| 1.5 Origem dos fibrócitos | 10 |
| 1.6 Identificação dos fibrócitos | 11 |
| 1.7 Participação do fibrócito na resposta imune | 13 |
| 1.8 Fibrócitos em doenças | 14 |
| 1.9 Justificativa | 16 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1 Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Sangue humano | 18 |
| 3.2 Parasito | 18 |
| 3.3 Cultura primária de fibrócitos de sangue humano | 18 |
| 3.4 Interação das culturas primárias de fibrócitos humanos por <i>L.</i> <i>amazonensis</i> | 19 |
| 3.4.1 Processamento para microscopia de fluorescência | 19 |
| 3.4.2 Quantificação da interação <i>in vitro</i> de fibrócitos por <i>L.</i> <i>amazonensis</i> | 20 |
| 3.4.3 Processamento para microscopia eletrônica de varredura | 20 |
| 3.4.4 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão – Rotina | 21 |
| 3.4.5 Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) | 21 |
| 3.4.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO) | 22 |
| 3.4.7 Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH) | 22 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.4.8 | Análise estatística..... | 22 |
| 4. | RESULTADOS | |
| 4.1 | Caracterização morfológica e fenotípica dos fibrócitos humanos..... | 23 |
| 4.2 | Análise da interação de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 30 |
| 4.2.1 | Análise quantitativa de fibrócitos contendo amastigotas de <i>L. amazonensis</i> aderidas na superfície celular..... | 37 |
| 4.2.2 | Análise fenotípica de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 37 |
| 4.3 | Análise ultraestrutural da interação de fibrócitos com <i>L. amazonensis</i> | 41 |
| 4.4 | Avaliação da produção de mediadores inflamatórios durante a interação de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 46 |
| 5. | DISCUSSÃO | 50 |
| 6. | CONCLUSÃO | 59 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|------------------------------|
| Figura 1: Status de endemividade das leishmanioses visceral e tegumentar no mundo, 2016. Adaptado de WHO, 2018. | 2 |
| Figura 2: Lesões causadas pela Leishmaniose Tegumentar. | 5 |
| Figura 3: Ciclo de vida de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> (Adaptado de Lipoldová e Demant, 2006). | 6 |
| Figura 4: Desenho esquemático das moléculas expressas e produzidas pelos fibrócitos. (Adaptado de Reilkoff et al., 2011)..... | 12 |
| Figura 5: Esquema ilustrativo sobre a origem de fibrócitos e monócitos de um único precursor na medula óssea e sua diferenciação (Adaptado de Macedo-Silva et al., 2014)..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figura 6: (A-B): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia óptica de campo claro..... | 25 |
| Figura 7: (A-B): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de varredura. | 26 |
| Figura 8: (A-D): Caracterização ultraestrutural da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão. | 27 |
| Figura 9: (A-D): Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos utilizando marcação dupla – CD45 / Colágeno tipo I por microscopia de fluorescência. | 28 |
| Figura 10: (A-D): Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos utilizando marcação dupla – CD45 / HSP-47 por microscopia de fluorescência. | 29 |
| Figura 11: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos contendo promastigotas de <i>L. amazonensis</i> aderidas. | 31 |
| Figura 12 (A-J): Análise da interação das culturas primárias de fibrócitos humanos com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 32 |
| Figura 13: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> internalizadas | 33 |
| Figura 14: Gráfico referente ao número total de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em fibrócitos humanos..... | 34 |
| Figura 15 (A-G): Análise de fibrócitos em degradação com <i>L. amazonensis</i> | 35 |
| Figura 16 (A-F) Análise da diminuição do número de fibrócitos com <i>L. amazonensis</i> internalizados..... | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 17 (A-G): Análise de fibrócitos humanos contendo amastigotas de <i>L. amazonensis</i> aderidas na superfície celular..... | 38 |
| Figura 18: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos contendo amastigotas de <i>L. amazonensis</i> aderidas na superfície celular | 39 |
| Figura 19 (A1-E5): Caracterização fenotípica dos fibrócitos durante a cinética de interação com <i>L. amazonensis</i> por microscopia de fluorescência. | 40 |
| Figura 20 (A-B): Micrografias eletrônicas de varredura da interação de fibrócitos humanos com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 42 |
| Figura 21 (A-B): Micrografias eletrônicas de varredura da interação de fibrócitos humanos com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> | 42 |
| Figura 22 (A-C): Micrografias eletrônicas de transmissão de fibrócitos humanos após 2 horas de interação. | 44 |
| Figura 23 (A-I): Micrografias eletrônicas de transmissão de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 45 |
| Figura 24: Análise por <i>Heat maps</i> da produção de citocinas presentes na interação de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 46 |
| Figura 25: Análise por <i>Heat maps</i> da produção de quimiocinas presentes na interação de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 47 |
| Figura 26: Análise por <i>Heat maps</i> da produção de NO presente na interação de fibrócitos humanos infectados <i>L. amazonensis</i> | 48 |
| Figura 27: Gráfico representativo da produção de LDH presente na interação de fibrócitos humanos com <i>L. amazonensis</i> | 49 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| APC | Células Apresentadoras de Antígenos |
| BSA | Soro Albumina Bovina |
| CCR | Receptor para Quimiocinas (CC) |
| CD | Grupo de Diferenciação (do inglês Cluster of Differentiation) |
| CXCR | Receptor para Quimiocinas (CX) |
| IFN | Interferon |
| GHO | Observatório Global de Saúde (do inglês Global Health Observatory) |
| Gr1 | Antígeno Presente na Série Granulocítica |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Óxido Nítrico sintase indutível |
| LC | Leishmaniose Cutânea |
| LDC | Leishmaniose Cutânea Difusa |
| LDH | Desidrogenase Láctica |
| LM | Leishmaniose Mucosa |
| LMC | Leishmaniose Mucocutânea |
| LSP/1 | Proteína Específica de Leucócitos |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| MCP-1 | Proteína Quimioatraente de Monócitos |
| M-CSF | Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos |
| MHC-I | Complexo de Histocompatibilidade do Tipo I |
| MHC-II | Complexo de Histocompatibilidade do Tipo II |
| MIP-1 | Proteína Inflamatória de Macrófagos |
| MMP | Metaloproteinases |
| NO | Óxido Nítrico |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |

| | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| OsO ₄ | Tetróxido de Ósmio |
| O ₂ ⁻ | Superóxido |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| PBS | Solução Salina Fosfatada |
| PFA | Paraformaldeído |
| RNI | Reativos Intermediários de Nitrogênio |
| ROI | Reativas Intermediários de Oxigênio |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TLR | Receptor Toll-Like |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TGF | Fator de Transformação do Crescimento |
| μl | Microlitro |

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses compõem um conjunto de doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários intracelulares obrigatórios agrupados na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e pertencentes ao gênero *Leishmania* (Lainson, 1997; Camargo & Barcinski, 2003; OMS, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) a considera uma das seis doenças infecciosas mais importantes, pelo seu alto nível de detecção e a capacidade de produzir deformidades (Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana – Ministério da Saúde, 2017), sendo também reconhecida como uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo.

Esta doença possui ampla distribuição mundial, com mais de 350 milhões de pessoas em risco, ocorrendo principalmente em áreas de maior taxa de pobreza, como a África, Ásia e América Latina, sendo associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, deficiências do sistema imunológico e falta de recursos. Dos 200 países e territórios que se reportaram à OMS, 97 destes são endêmicos para as leishmanioses, dentre eles: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen (revisto em Georgiadou et al., 2015; GHO, 2018) (Figura 1).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados marsupiais e mamíferos (incluindo o homem), sendo transmitidos por insetos vetores da ordem Díptera, pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi & Tesh, 1993; Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana (LTA) – Ministério da Saúde, 2017). Os parasitos são digenéticos (heteroxenos), alternando sua morfologia entre formas com flagelos livres, denominadas promastigotas, as quais são encontradas em hospedeiros invertebrados, que sobrevivem no interior do tubo digestório de flebotomíneos, e as amastigotas com flagelo interiorizado, que se encontram em hospedeiros vertebrados, e se multiplicam no interior dos fagolisossomos de células fagocíticas (Alexander & Russel, 1992; McConville et al. 2007; Leta et al., 2014).

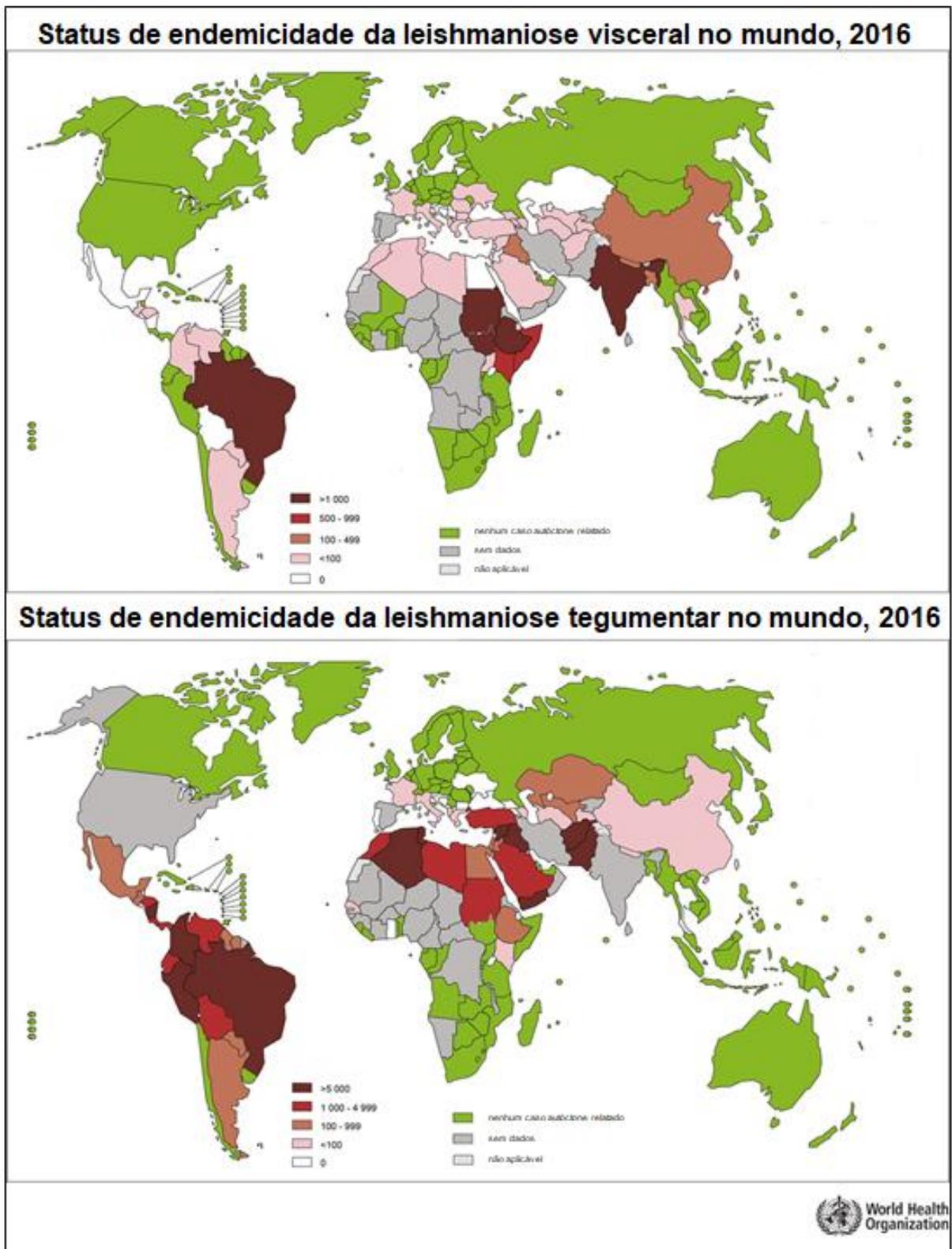


Figura 1: Status de endemicidade das leishmanioses visceral e tegumentar no mundo, 2016. Adaptado de WHO, 2018.

Esta doença apresenta diferentes modalidades clínico-epidemiológicas, podendo ser agrupadas basicamente em 2 categorias: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas possuam a doença, com 200 - 400 mil novos casos de leishmaniose visceral e 0,7 - 1,2 milhões

de novos casos de leishmaniose tegumentar por ano em todo o mundo (revisto em Georgiadou et al., 2015; OMS, 2018).

A leishmaniose visceral também conhecida como Kalazar é considerada a forma mais grave da infecção, e tem como agentes etiológicos a *Leishmania (Leishmania) infantum* e a *Leishmania (L.) donovani* (Lukes et al., 2007). A disseminação dos parasitos ocorre por via linfática, causando febre recorrente, palidez, perda de peso, anemia, leucopenia, inchaço do baço e fígado (Berman, 1997; OMS, 2018).

De acordo com o Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana (LTA) – Ministério da Saúde, 2017, a leishmaniose tegumentar abrange diversas formas clínicas:

1) Leishmaniose cutânea (LC), a forma mais comum, é causada pelas espécies: *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (L.) mexicana* e *Leishmania (L.) amazonensis* no Novo Mundo (revisto em Gontijo e Carvalho, 2003). As lesões normalmente são únicas, auto-curáveis e podem gerar pequenas cicatrizes. Dependendo da espécie do parasito, até 10% dos casos de leishmaniose cutânea podem evoluir para manifestações mais graves (Martinez & Pertesen, 2014; Burza, et al., 2018). A LC pode ser classificada de acordo com as principais apresentações clínicas:

I) cutânea localizada - causada por *Leishmania (V.) guyanensis*, as quais podem ser caracterizadas por lesões únicas ou múltiplas. Essas lesões costumam se localizar próximo ao sítio de inoculação do parasito;

II) cutânea disseminada – o agente patogênico é *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Se caracteriza por múltiplas lesões e, em alguns casos, as lesões podem chegar a centenas. As lesões são ulceradas e podem estar distantes do sítio de inoculação do parasito;

III) cutânea difusa (LDC) - o agente patogênico é *L. amazonensis* nas Américas e *L. aethiopica* na África (revisto por Akhound et al., 2016; van Griensven et al., 2016). É considerada como uma das manifestações mais graves da leishmaniose tegumentar. Geralmente é resistente ao tratamento e não é auto curável (Bacon et al., 2013; Burza, et al., 2018). Caracteriza-se por lesões cutâneas múltiplas, ricas em parasitos, que se propagam por toda superfície corporal, sendo deformante e afastando o paciente do convívio social (revisto em Gontijo e Carvalho, 2003; Azeredo-Coutinho e Mendonça, 2014).

2) Leishmaniose mucosa (LM), que tem como principal agente patogênico a *L. braziliensis* (Amato et al., 2008; Rojas-Jaimes et al., 2018), mas outras espécies podem causar lesões na mucosa, tais como: *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Osório et al, 1998). A LM é considerada como uma das manifestações mais graves da leishmaniose tegumentar (Passi, et al., 2014; Burza, et al., 2018). As lesões desta forma clínica se difundem na pele, levando a uma grande destruição tecidual das cavidades nasais, palato, tonsilas, seguidas da faringe, laringe e cavidade oral. Os casos mais avançados podem gerar complicações como pneumonia aspirativa, insuficiência respiratória, sendo fatal em alguns casos (Marsden, 1986; revisto em Gontijo & Carvalho, 2003; Cruz et al., 2016); A LM pode ser classificada de acordo com as seguintes apresentações clínicas:

I) mucosa tardia - causada principalmente por *L. braziliensis*, porém também pode ser causada pela *L. guyanensis* na região da calha norte do Rio Amazonas. As lesões podem ser encontradas na face e na mucosa nasal, caracterizam-se por lesões múltiplas ou de longa duração, as quais podem surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea;

II) sem lesão cutânea prévia - causada principalmente por *L. braziliensis*, as lesões podem ser caracterizadas como isoladas, não sendo possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia. As lesões podem passar despercebidas, pois são pequenas, não ulceradas e de evolução rápida.

III) mucosa primária - podendo ser causada por diferentes espécies de *Leishmania* que causam a lesão cutânea no Brasil, essas lesões podem ser encontradas na mucosa ou semimucosa (lábios genitais), as quais ficam expostas à picada do inseto vetor.

3) Leishmaniose mucocutânea (LMC), tendo como as principais espécies causadoras desta forma clínica a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*. As lesões podem ser iniciadas na região da mucosa nasal, podendo se espalhar pela faringe, laringe, pele do nariz e lábios. Os sintomas variam entre desconforto e dor. Quando a infecção se encontra na região nasal, o nariz pode ser atrofiado, o septo cartilaginoso destruído no que acarreta a falta de olfato do paciente. Em casos extremos pode causar morte (revisado por Torres-Guerrero *et al.*, 2017). A LMC pode ser dividida em dois grupos:

I) mucocutânea concomitante: ocorre simultaneamente na presença de lesão cutânea e mucosa.

II) mucocutânea contígua: as lesões ocorrem por contiguidade a uma lesão cutânea ativa ou cicatrizada (Azeredo-Coutinho e Mendonça, 2014).



Figura 2: Lesões causadas pela Leishmaniose Tegumentar.

A: Forma cutânea – reproduzida por Torres-Guerrero et al., 2017. **B:** Forma cutânea difusa – reproduzida por Purohit et al., 2012. **C e D:** Forma mucosa tardia – reproduzida pelo Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana (LTA) – Ministério da Saúde, 2017. **E e F:** Forma mucocutânea oronasal grave – reproduzida por Burza et al., 2018.

A gravidade e a forma clínica da doença estão diretamente relacionadas com a espécie do parasito, bem como fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro (Kane e Mosser, 2000). No Brasil a *L. amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar e apresenta um amplo espectro da doença (Barral et al., 1991). Estudos indicam que a *L. amazonensis* está aumentando sua distribuição geográfica, sendo responsável por apresentações clínicas incomuns em novas áreas de transmissão (Azeredo-Coutinho et al., 2007), como sendo a única

espécie responsável pelos casos de LCD no Brasil (Azeredo-Coutinho e Mendonça, 2014).

1.2 Ciclo evolutivo da *Leishmania*

A transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* ocorre no momento do repasto sanguíneo onde o inseto vetor, a fêmea do flebotomíneo, se alimenta do sangue de indivíduos contaminados. O inseto provoca o dilaceramento do tecido, ocorrendo o extravasamento sanguíneo e, ingerindo macrófagos contendo amastigotas em seu interior ou amastigotas livres no tecido. No trato digestório do inseto vetor as amastigotas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, aderindo ao epitélio do intestino do flebotomíneo. Após ciclos de divisões na porção anterior do epitélio intestinal, as formas promastigotas procíclicas se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas, sendo regurgitadas na derme do hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo, juntamente com imunomoduladores e vários componentes salivares (Rogers & Bates, 2007).

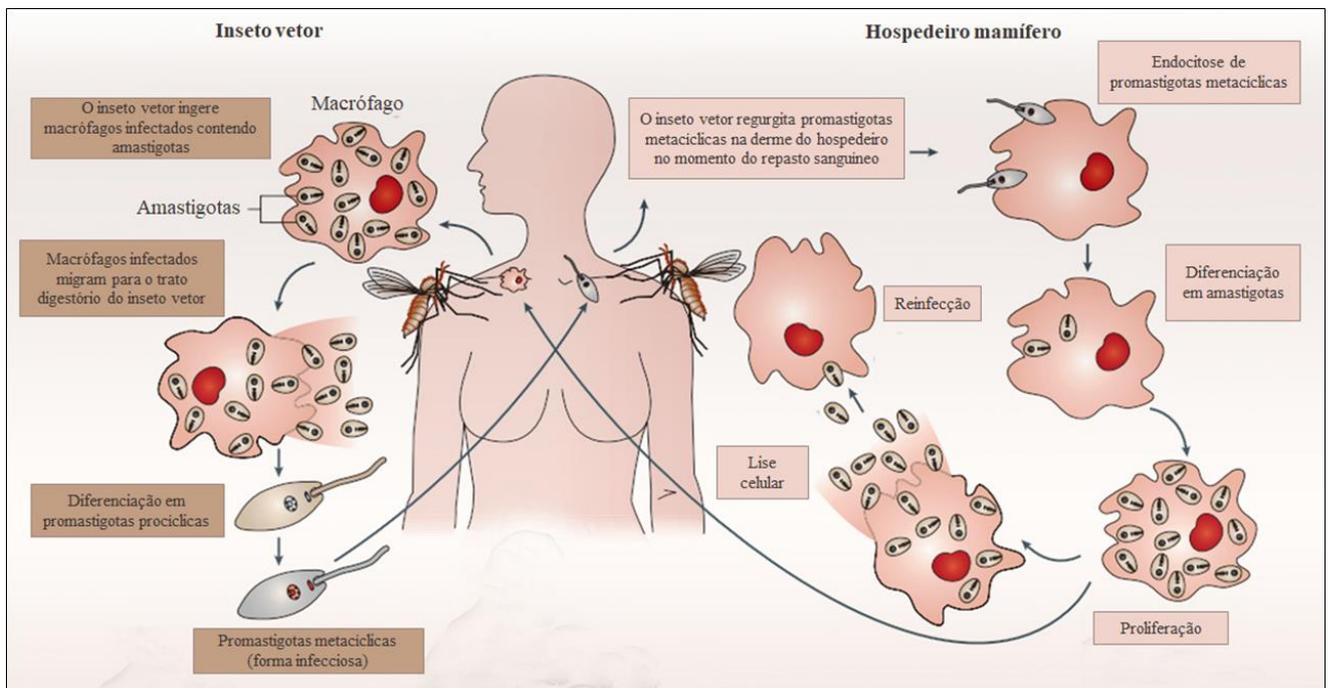


Figura 3: Ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania* (Adaptado de Lipoldová e Demant, 2006).

As formas promastigotas metacíclicas podem ser endocitadas por células residentes na derme, células inflamatórias oriundas do sangue periférico (Peters et

al., 2008; Guerra et al., 2010), e por células do sistema fagocítico mononuclear, como os macrófagos, que se encontram no local da picada do inseto. Depois de estabelecer uma residência intracelular, as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas que se replicam e promovem o rompimento celular no que podem ser internalizadas por outros tipos celulares ou novamente ingeridas pelo inseto vetor no momento de um novo repasto sanguíneo, completando assim o seu ciclo celular (Grimaldi et al., 1983; Côrte-Real et al., 1988; Kaye & Scott, 2011; Leta et al., 2014) (Figura 3).

1.3 Resposta celular frente à infecção por *Leishmania*

Os momentos iniciais da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* ocorrem na pele do hospedeiro. A pele apresenta um sistema imune próprio onde as células residentes possuem um papel crucial na manutenção da homeostasia tecidual e na resposta imune inicial a patógenos através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Williams e Kupper, 1996; Martin e Leibovich, 2005; Scorza, et al., 2017). Neste contexto, células residentes e inflamatórias são atraídas para o local da infecção ficando expostas ao parasito, podendo ocorrer a endocitose da *Leishmania*, podendo assim funcionar como células apresentadoras de antígenos (APC) (Ohyama et al., 2002; Prina et al., 2004; von Stebut & Tenzer, 2017), sendo de extrema importância na definição da resposta imune.

A susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania* está relacionada ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro e principalmente à espécie de *Leishmania* envolvida, já que várias espécies de *Leishmania* podem modular de formas diferentes importantes mediadores da resposta inflamatória. A resposta Th1 está relacionada com resistência à infecção fazendo com que as células liberem citocinas como IFN- γ e TNF, e a resposta Th2 está relacionada à suscetibilidade à infecção, o que levam as células a liberarem níveis de IL-4 e IL-10 que está relacionado à incapacidade de controle do parasito, essa resposta é vista em modelos de infecções utilizando a *L. major* (revisito por Sacks & Noben-Trauth, 2002; Sacks & Anderson, 2004; Conceição-Silva et al., 2014). No entanto, em modelos de infecções utilizando a *L. amazonensis*, não apresenta uma dicotomia da resposta Th1/Th2 sendo a maioria das linhagens de camundongos susceptíveis, desenvolvendo lesões crônicas semelhantes às de pacientes com leishmaniose cutânea e ocorrendo um aumento progressivo da lesão e do número de parasitos

(Scott et al, 1988; Ji et al, 2002; Abreu-Silva et al. 2004). Foi demonstrado que os camundongos C57Bl/10 são capazes de cicatrizar após a infecção por *L. major*, contudo quando infectados com *L. amazonensis* estes não foram capazes de cicatrizar devido à ausência de uma resposta Th1 (Afonso e Scott, 1993; Pinheiro & Bergmann, 2007). Os camundongos da linhagem BALB/c são os mais susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*. Entretanto, esta susceptibilidade não está relacionada com a polarização da resposta Th2 (Afonso e Scott, 1993), já que apresentam tanto linfócitos T CD4+ produtores de citocinas pró-inflamatórias quanto linfócitos T CD4+ produtores de citocinas anti-inflamatórias, caracterizando uma expansão balanceada de linfócitos T CD4+ com caráter Th1 e Th2 durante todo o curso da infecção (Ji et al., 2002).

Entre as células residentes que compõem o sistema imune inato frente ao patógeno, observam-se os macrófagos, que são células capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI), ambos com atividade microbicida. As moléculas associadas com a produção de ROI em macrófagos são NADPH oxidase 2 e óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que produzem superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO) (Aktan, 2004; Rossi & Fasel, 2018). Alguns trabalhos demonstram que o óxido nítrico tem o papel importante no controle da infecção por *Leishmania* (Diefenbach et al., 1999, Murray & Delph-Etienne, 2000; Carneiro et al., 2016), contudo esse protozoário possui mecanismos que interferem a produção de NO pela célula hospedeira (Cunningham, 2002; Rossi & Fasel, 2018).

Muitos autores descreveram que os fibroblastos são as células mais abundantes do tecido conjuntivo, sendo estas as principais responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular, atuando diretamente na homeostase e no reparo tecidual (McAnulty, 2007), bem como na primeira linha de defesa contra patógenos, participando na resposta inflamatória inicial (revisito por Fuhlbrigge & Kupper, 2004). Alguns trabalhos demonstram que os fibroblastos são susceptíveis às várias espécies de *Leishmania* (Côrte-Real et al., 1995; Tarantino et al., 2001), atuando como célula hospedeira durante a fase crônica latente da doença, sendo capazes de endocitar as formas do parasito, mas sem a ação microbicida, fazendo com que estas células sejam utilizadas pelo parasito como parte de seu mecanismo de escape (Bogdan et al., 2000). Quando estimulados, os fibroblastos são ativados e passam a produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem agir de maneira autócrina ou parácrina, amplificando a resposta inflamatória (Boxman et al., 1996).

Em relação às células inflamatórias, os neutrófilos, são identificados como um dos grupos mais abundantes do sangue periférico, sendo recrutados rapidamente para o local da lesão, fazendo com que estas células atuem ativamente contra o parasito ou também podendo atuar na sobrevivência da *Leishmania*. Foi descrito que os neutrófilos podem contribuir para o controle de algumas espécies de *Leishmania* (Brune et al., 2013; Barbosa et al., 2018), interagindo com macrófagos infectados (Novais et al., 2009). Porém a fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados com *L. major* por macrófagos, pode fazer com o que os macrófagos não sejam ativados, facilitando a sobrevivência do parasito. Esse evento é descrito como “Cavalo de tróia” onde o parasito entra silenciosamente em macrófagos o que pode ser entendido como um mecanismo de escape que subverte o sistema imune do hospedeiro vertebrado (Ribeiro-Gomes et al., 2004; Van Zandbergen et al., 2004; Conceição-Silva et al., 2014; Scott & Novais, 2016). Além disso, os neutrófilos podem secretar citocinas como IFN- γ e TNF, além de quimiocinas, as quais são importantes para o recrutamento e ativação de grupos celulares residentes como os macrófagos, bem como, células inflamatórias como os linfócitos (Nathan, 2006; Mayadas et al., 2014).

Outra célula importante na resposta imune inata é a célula dendrítica epidérmica, também conhecida como célula de Langerhans, pois ela inicia uma resposta imune adaptativa local de células T (Udey et al., 2001). Essas células são especializadas no reconhecimento dos patógenos e na migração de antígenos para os linfonodos drenantes, onde podem ativar linfócitos T específicos (revisado por Brandonisio et al., 2004; Brewig et al., 2009). Foi descrito, em modelo *in vitro*, que esta célula é capaz de endocitar preferencialmente amastigotas e esta internalização se associa à expressão de MHC de classe I e II, moléculas coestimulatórias e, elaboração de IL-12 (von Stebut et al., 1998; Udey et al., 2001).

Outros grupos celulares inflamatórios são descritos na literatura como participantes da resposta imune aos parasitos do gênero *Leishmania*, como por exemplo os eosinófilos (Guerra et al., 2010; Blom et al., 2018). Grab e colaboradores (2004) sugeriram a participação dos fibrócitos na resposta imune a parasitos do gênero *Leishmania* e que estes poderiam ter relação com os diferentes perfis de resposta imune observados nas leishmanioses.

1.4 Fibrócitos

Os fibrócitos foram descritos por Bucala e colaboradores (1994) a partir de um modelo aplicado para o estudo sobre cura de lesões. Neste estudo, foi implantada uma esponja de polivinil-álcool no tecido subcutâneo de camundongos, com o objetivo de analisar quais seriam os tipos celulares que estariam envolvidos no processo de reparo tecidual. Foi observado que havia um rápido influxo de células do sangue periférico, como monócitos, neutrófilos e uma sub-população de linfócitos. Além destas células, observou-se um grande número de células aderentes com morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos. A presença destas células coincidente com a entrada de células inflamatórias circulantes sugeriu que a sua origem poderia ser o sangue periférico. Após o cultivo das células mononucleares do sangue, foi realizado uma análise fenotípica, no qual foram observadas características distintas de outros tipos celulares, como a expressão de moléculas típicas de leucócitos (CD45) e de células progenitoras (CD34), associadas também à produção de proteínas de matriz extracelular. Este estudo originou o primeiro relato do isolamento de uma célula com morfologia similar à de fibroblastos, porém com fenótipo de leucócitos, características distintas e originais. Essa nova sub-população foi então denominada de “fibrócito”, a qual provém a partir da combinação entre o radical grego kitos – que significa célula e o radical original do latim, fibro – referente à fibra (Bucala et al., 1994; revisto em Quan et al., 2004).

1.5 Origem dos fibrócitos

Os fibrócitos são células encontradas no sangue periférico de mamíferos e estima-se que a sua população representa cerca de 0,1 - 0,5% do número das células não eritrocíticas (Bucala et al. 1994; Chesney et al. 1998), e apresentam um rápido influxo para regiões do organismo que foram lesionadas (Bucala et al., 1994; Abe et al., 2001), no entanto, a sua origem ainda é controversa.

Alguns autores revelaram que os fibrócitos seriam originados de uma sub-população de células mononucleares de sangue periférico, os monócitos CD14 positivos (Pilling, et al., 2003). Abe e colaboradores (2001) evidenciaram que os monócitos CD14 positivos humanos dão origem a fibrócitos quando cultivados 10 a 14 dias na presença de soro ou 3 dias na ausência de soro. Pilling e colaboradores (2003), observaram que monócitos CD14 positivos humanos se diferenciaram em

fibrócitos quando cultivados a 3 a 6 dias na ausência de soro ou plasma. Niedermeier e colaboradores (2009) mostraram que monócitos Gr1+, CD115+, CD11b+ obtidos do baço de camundongos dão origem a fibrócitos quando cultivados por 15 dias na presença de soro ou 5 dias na ausência de soro. Todavia, os relatos sobre a origem dos fibrócitos a partir de monócitos CD14 positivos não são definitivos. Outros autores sugerem que os fibrócitos teriam sua origem em precursores mesenquimais na medula óssea. Essas evidências surgiram quando autores utilizaram células da medula óssea, coletadas do fêmur de camundongos doadores machos e transplantadas para camundongos receptores fêmeas, gerando quimeras. A extração total da medula óssea dos camundongos receptores e o transplante das células dos camundongos doadores, demonstraram que a resposta inflamatória em lesões experimentais induzidas nos camundongos receptores apresentava o perfil de mais de 90% dos fibrócitos encontrados nas lesões e, no sangue dos camundongos, apresentaram o cromossomo Y marcado, evidenciando que os fibrócitos das fêmeas receptoras tiveram sua origem nas células da medula óssea transplantadas (Chesney et al., 1998; Phillips et al., 2004; Phan, 2008). Com base nisto concluíram que os fibrócitos se originaram a partir de células mesenquimais da medula óssea dos camundongos machos injetadas no sangue periférico das fêmeas dos camundongos estudados. Macedo-Silva e colaboradores (2014) sugeriram essa mesma hipótese a partir da detecção de fibrócitos diferenciados na população de células mononucleares do sangue periférico de camundongos BALB/c saudáveis. Esse estudo compilou a ideia de que os fibrócitos têm origem mononuclear, mas sugerem que essas células partilham de um precursor mielóide comum derivado da medula óssea com monócitos circulantes, que permite sugerir que essas células sejam diferentes de outros tipos celulares, como os monócitos, macrófagos e fibroblastos.

1.6 Identificação dos fibrócitos

Estudos têm expandido o conhecimento sobre a expressão de marcadores neste tipo celular. Para identificar precisamente os fibrócitos em seu contexto biológico, se faz necessário avaliações adicionais incluindo análise morfológica, marcadores adicionais e proteínas de matriz extracelular (Quan et al., 2004). Análises fenotípicas apontam que os fibrócitos apresentam características tanto de fibroblastos quanto de leucócitos, produzindo colágeno (tipo I, III e IV) e fibronectina, mas também

expressando o antígeno comum de leucócitos CD45 (Bucala et al., 1994; Abe et al., 2001, revisto em Quan et al., 2004; Pilling et al., 2009; revisto por Reilkoff, et al., 2011; Bianchetti et al., 2012).

Alguns autores sugerem marcadores adicionais na identificação de fibrócitos tais como, colágeno-1 ou pró-colágeno do tipo 1 (Schmidt et al., 2003; revisto em Herzog e Bucala, 2010; Sun et al., 2018), HLA-DR - antígeno leucocitário humano (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Isgro et al., 2013), prolil 4-hidroxilase (Abe et al., 2001; Pilling et al., 2009; revisto em Herzog & Bucala, 2010), LSP/1 - proteína específica de leucócitos (Yang et al. 2005; Pilling et al., 2009) e Hsp47 (proteína de choque térmico associada a biossíntese de colágeno do tipo I). Macedo-Silva e colaboradores (2014) utilizaram uma dupla marcação de CD45 e Hsp47 para a identificação dos fibrócitos provenientes do sangue periférico de camundongos saudáveis.

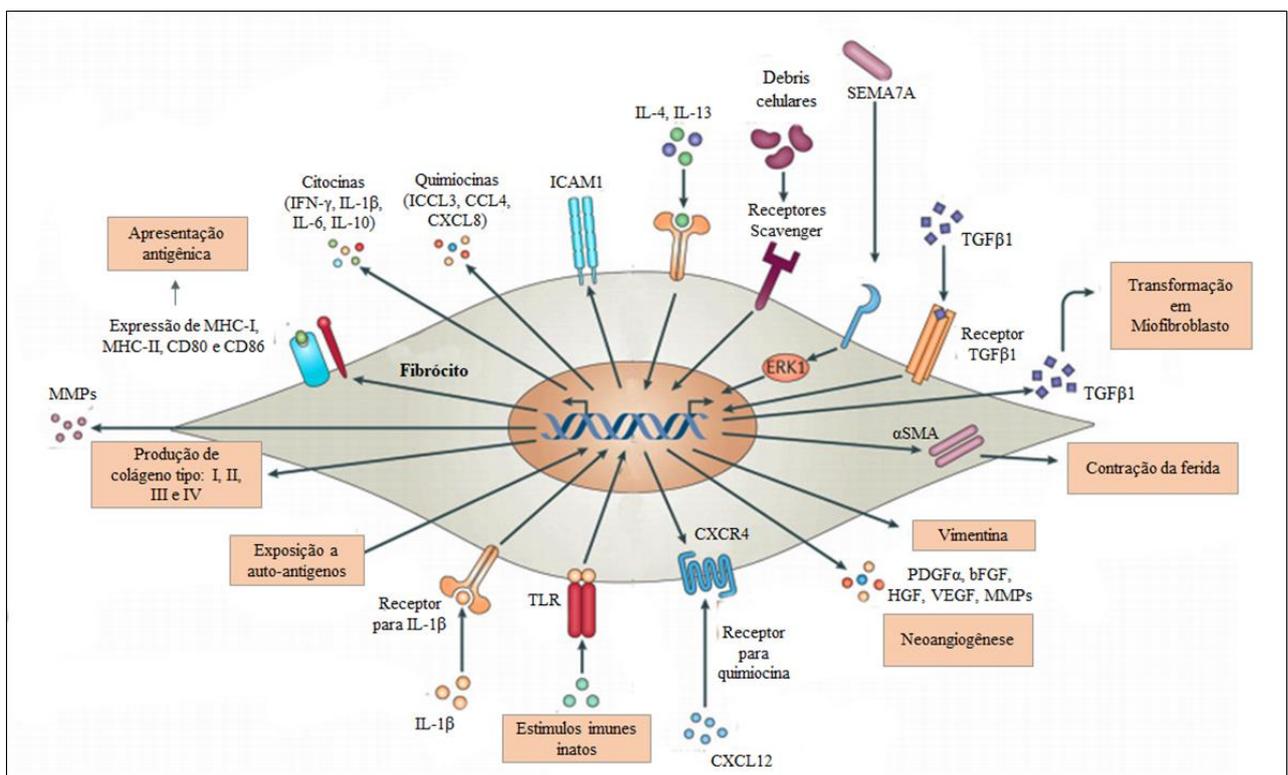


Figura 4: Desenho esquemático das moléculas expressas e produzidas pelos fibrócitos. (Adaptado de Reilkoff et al., 2011).

Além disso, os fibrócitos podem expressar marcadores que estão presentes em outros tipos celulares: CD34 (células progenitoras), CD13 (monócitos, macrófagos e fibroblastos), CXCR4 (monócitos e macrófagos), CD11b, CD11c, CD11d, CD10 e receptores scavenger (macrófagos), receptores do tipo Toll (TLR) e receptores Fc

(fibroblastos e macrófagos), colágeno tipo I, III e IV, glicosaminoglicanos (fibroblastos), MHC-I, MHC-II e moléculas co-estimuladoras B7-1/B7-2 (células dendríticas) (Pilling et al., 2009; revisto por Herzog & Bucala, 2010; revisto por Reilkoff, et al., 2011; Peng & Herzog, 2012) (Figura 4).

1.7 Participação do fibrócito na resposta imune

Alguns relatos têm identificado a participação dos fibrócitos em processos inflamatórios e na fase proliferativa da cicatrização (revisto por Reilkoff, et al., 2011). Além disso, atuam na ativação de linfócitos T virgens (Chesney et al., 1997) e na ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos (Balmelli et al., 2005).

Os fibrócitos, em configurações patológicas, atuam secretando fatores de crescimento e citocinas (Cowper & Bucala, 2003). Os fibrócitos podem participar no reconhecimento de antígenos e na apresentação antigênica, expressando todas as proteínas de superfície necessárias, incluindo MHC de classes I e II, moléculas co-estimuladoras como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), podendo assim desempenhar um importante papel na ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa (Chesney et al., 1997; Balmelli et al., 2005; Isgro et al., 2013; Suzuka, 2014). Além disso, os fibrócitos produzem quimiocinas que regulam o recrutamento e o tráfico de células inflamatórias (revisto por Herzog & Bucala, 2010), como a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) (Chesney et al., 1997; Kao et al. 2011). Em estudos com fibrócitos humanos, essas células podem expressar receptores de quimiocinas como, CCR2, CCR3, CCR5 e CXCR4 que possuem a função de controlar a migração e o recrutamento dos fibrócitos no tecido lesionado (revisto por Peng & Hezorg, 2012). São capazes de expressar citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF), MIP1 α/β , fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e metaloproteinases tais como e MMP-9 em resposta à estimulação de IL-1 β (Chesney et al., 1998; revisto por Herzog & Bucala, 2010). Os fibrócitos também expressam receptores para porção Fc das imunoglobulinas (Bellini & Matoli, 2007), podendo endocitar e degradar antígenos de forma eficiente (Balmelli et al., 2005).

Uma interação complexa de citocinas, quimiocinas e vias de sinalização está envolvida na diferenciação de fibrócitos em locais de lesões (Sakai et al., 2008; Niedermeir et al., 2009). Os fibrócitos podem se diferenciar em fibroblastos e miofibroblastos por estímulos de TGF- β 1 ou endotelina-1 (ET-1), a partir das vias

Smad 2/3 e SAPK/JNK MAPK ativadas, e podem se diferenciar em adipócitos por estímulos de IFN- γ (revisado por Sahebally et al., 2013). Citocinas pro-fibróticas (IL-4 e IL-13) também estão envolvidas neste processo, promovendo a diferenciação de monócitos em fibrócitos e de fibrócitos em miofibroblastos, sem induzir proliferação (Hong et al., 2007; revisado por Sahebally et al., 2013). Porém, essa diferenciação pode ser inibida por algumas citocinas, tais como IFN- γ , TNF e IL-12, e por estímulo de agonistas presentes na resposta imune inata, como por exemplo, o receptor TLR-2 (revisado por Reilkoff et al., 2011).

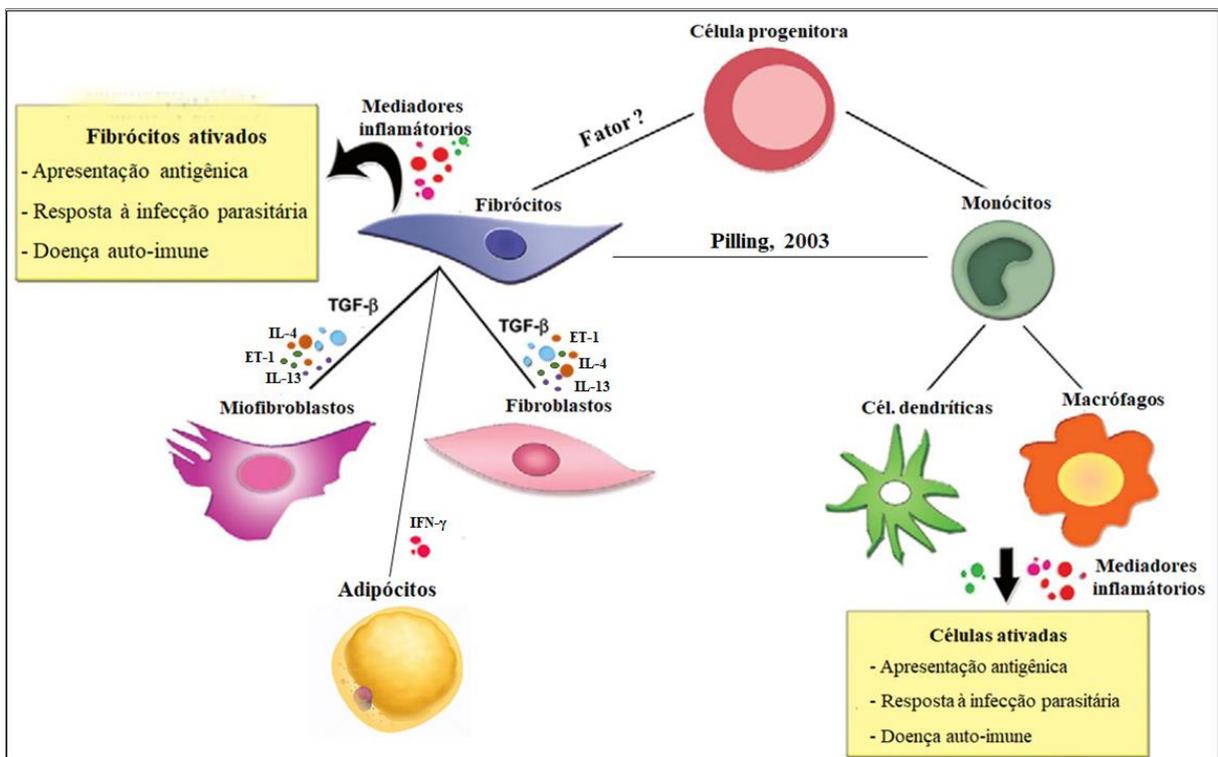


Figura 5: Esquema ilustrativo sobre a origem de fibrócitos e monócitos de um único precursor na medula óssea e sua diferenciação (Adaptado de Macedo-Silva et al., 2014).

Grupos celulares que se originam durante a diferenciação de fibrócitos e monócitos determinados por diferentes moléculas.

1.8 Fibrócitos em doenças

Por ser considerada uma célula que migra rapidamente para locais de lesão, em muitas doenças os fibrócitos estão associados à cicatrização de feridas, remodelamento dos tecidos afetados (Abe et al., 2001; Chesney et al., 1998), fibrose e na participação nos processos patológicos como, por exemplo, na asma. Nessa

condição, o número de fibrócitos é aumentado, fazendo com que se diferenciem em miofibroblastos contráteis após à exposição ao alérgeno. Essas células produzem matriz extracelular na membrana basal dos pulmões, atuando assim nos processos iniciais da inflamação e remodelamento pulmonar (Nihlberg et al., 2006; revisto por Matolli, 2015).

Os fibrócitos estão presentes na formação de fibrose na Doença de Crohn, onde são recrutadas no início da fase inflamatória, podendo se diferenciar em fibroblastos ou miofibroblastos até a fase da fibrose. Assim, os fibrócitos podem aumentar a inflamação através da produção de TNF e podem aumentar diretamente a fibrose através da produção de Colágeno tipo I (Sazuka et al., 2013). Foi visto que os fibrócitos estão associados com o processo de reparo após lesão em cardiomiopatias isquêmicas causadas por obstruções fibróticas (Haudek et al., 2006; Herzog & Bucala, 2010). Além disso, os fibrócitos podem participar dos processos homeostáticos de recuperação em lesões pulmonares agudas (Tai, 2017).

Em relatos de autores que estudaram as infecções experimentais causadas por *Schistosoma japonicum* e *S. mansoni* em camundongos, foi observado a presença dos fibrócitos em áreas de deposição de matriz e no granuloma, sugerindo que essas células podem estar atuando na produção de proteínas da matriz extracelular, o que sugere que os fibrócitos atuam nos processos infecciosos durante a esquistossomose (Chesney et al., 1998; Stavitsky, 2004).

Com base na descrição de Grab (2004), de que os fibrócitos poderiam estar participando da resposta imune a parasitos do gênero *Leishmania*, Macedo-Silva e colaboradores (2014) evidenciaram a interação e a endocitose, *in vitro*, de formas promastigotas de *L. amazonensis* por fibrócitos oriundos do sangue periférico de camundongos BALB/c. Neste estudo os autores observaram que os fibrócitos debelavam a infecção após 72 horas de interação, e foi visto que essas células sintetizavam grande quantidade de óxido nítrico (NO) nos primeiros momentos da interação, o que pode ter induzido a resolução da infecção. Esse estudo abriu perspectivas para abordagens aprofundadas da interação de parasitos do gênero *Leishmania* com fibrócitos, podendo ser um fator determinante para a elucidação da infecção.

1.9 Justificativa

Os eventos iniciais na interação parasito/hospedeiro são importantes para a patogênese das leishmanioses. No sítio de inoculação do parasito do gênero *Leishmania*, um processo inflamatório é iniciado, com a participação de células residentes e provenientes do sangue. A apresentação antigênica, por estas células, incluindo os fibrócitos humanos, pode ter um importante papel nesta patologia, como sugerido por Grab e colaboradores (2004). Macedo-Silva e colaboradores (2014) demonstraram que os fibrócitos de sangue periférico dos camundongos BALB/c expressavam CD45+/HSP47+, e observaram em análises *in vitro*, que estas células foram capazes de endocitar promastigotas de *L. amazonensis*, ocorrendo a conversão para amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos. Também detectaram a alta taxa de óxido nítrico liberada nas duas primeiras horas de infecção, um dos fatores determinantes para a interrupção da infecção. Os resultados mostrados acima nos levaram a diversas questões a respeito da interação dos fibrócitos. Um dos principais pontos de indagação tem relação com a participação de fibrócitos humanos na infecção por *Leishmania in vitro* e com a indução da doença *in vivo*.

Com isso, entendemos que o estudo sobre a interação de fibrócitos humanos com promastigotas de *Leishmania* tem grande relevância, uma vez que esta célula pode estar presente nos momentos iniciais da infecção e pode participar do direcionamento da resposta ao parasito em humanos no contexto do estabelecimento da doença ou da cura espontânea. Assim, utilizamos diferentes técnicas para elucidar a resposta dos fibrócitos humanos frente à interação com *Leishmania in vitro*, buscando contribuir com a expansão do conhecimento a respeito de fibrócitos e de seu papel no curso da infecção em humanos, primariamente na forma cutânea (LTA- leishmaniose cutânea) ocasionada por *L. amazonensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a interação *in vitro* de fibrócitos do sangue periférico humano com *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção, caracterizar e identificação de fibrócitos presentes no sangue periférico humano;
- Análise da interação dos fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis*, pelos seguintes métodos: microscopia óptica de campo claro, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.
- Investigar a produção de mediadores químicos inflamatórios produzidos pelos fibrócitos humanos após a interação com promastigotas da *L. amazonensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sangue humano

Para a realização das culturas primárias de fibrócitos, foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC humano) obtido a partir de “*buffy-coats*” (bioproduto proveniente da concentração de leucócitos) de doadores normais e não identificados, cedidos pelo banco de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (SH-HUCFF/UFRJ), através de termo de cooperação técnico-científico, em seguimento às normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde através da Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (CEP/Fiocruz) com número de parecer 2.289.780.

3.2 Parasito

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis*, da cepa MHOM/BR/77/LTB0016. Os parasitos foram cultivados no Laboratório de Biologia Estrutural – Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, RJ em meio sólido NNN (Nicole, Novi e McNeal) e meio líquido Schneider (Sigma – Aldrich Co.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidos em estufa à temperatura de 26°C, sendo utilizados na fase estacionária de crescimento até quinta passagem *in vitro*.

3.3 Cultura primária de fibrócitos de sangue humano

Os fibrócitos foram obtidos de “*buffy-coats*” do sangue humano que foram diluídos na proporção 1:1 em PBS, colocados em solução FicollHypaque® 1077 (Sigma-Aldrich Co.) e centrifugados a 560 xg por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a camada de células mononucleares foi coletada, lavada em solução salina fosfatada (PBS), plaqueada em placas de 24 poços na densidade de 3×10^5 células/lamínula de plástico e/ou em garrafas de 25cm² na densidade de 5×10^6 células em meio Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium/F12 (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich Co.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco TM.), 0,2% de L-glutamina (Sigma-Aldrich Co.), mantidas em estufa na temperatura de 37°C e

em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após plaqueamento, as células não aderentes foram retiradas através de lavagens com PBS, centrifugadas à 450 xg por 10 minutos e replaqueadas em novas garrafas e/ou placas em meio DMEM F-12 (Sigma-Aldrich Co.) com 10% de SFB (Gibco TM.) e 0,2% de L-glutamina (Sigma-Aldrich Co.), estufa na temperatura de 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ por mais 24 horas. As células aderentes tanto do primeiro e do segundo plaqueamento foram mantidas em meio DMEM F-12 (Sigma-Aldrich Co.) contendo 0,2% de L-glutamina (Sigma-Aldrich Co.) na ausência de soro, com a troca de meio a cada 5 dias e mantidas em cultivo de 15 a 20 dias.

3.4 Interação das culturas primárias de fibrócitos humanos por *L. amazonensis*

Com o objetivo de avaliar o comportamento *in vitro* dos fibrócitos humanos frente à interação com *L. amazonensis*, as células cultivadas durante 15 dias foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos por célula em meio DMEM/F12 contendo 0,2% L-glutamina. Após 2h de incubação as culturas foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitos que não aderiram à membrana das células e os sobrenadantes das culturas foram coletados em diferentes intervalos de tempo (2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 10 dias e 15 dias) e armazenados à -70°C para posterior dosagem das concentrações de óxido nítrico, citocinas pró e anti-inflamatórias e Lactato desidrogenase (LDH). Alternativamente, as células infectadas com a *L. amazonensis*, foram avaliadas quanto à morfologia e à carga parasitária nos diferentes tempos de cultura.

3.4.1 Processamento para microscopia de fluorescência

Para a caracterização fenotípica dos fibrócitos nas culturas primárias infectadas (2 horas, 24 horas, 144 horas, 10 dias e 15 dias) e controle, as células foram fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) por 40 minutos à 4°C, em seguida foram lavadas em PBS e incubadas por 1 hora à 4°C em solução de bloqueio contendo 10% de soro de carneiro, 0,5% de Triton-X100 e 3% de BSA (soro albumina bovina). Após o bloqueio, foi feita uma dupla marcação durante 3 dias: inicialmente, uma incubação com anticorpo primário extracelular anti-CD45 - coelho

1:100 (Abcam) diluído em PBS + 1% BSA e mantidos *overnight* à 4°C. No segundo dia, as células foram lavadas (3X por 10 minutos) em PBS + 1% BSA e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida com anticorpo secundário apropriado anti-coelho Alexa Flour 488 1:500 (Thermo Fisher – Invitrogen). Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS + 1% BSA e incubadas com anticorpo intracelular anti-HSP 47 - mouse 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) ou anti-colágeno tipo I - cabra 1:40 (Sigma-Aldrich Co.) diluído em 10% SFB e 0,5% Triton-X100 e mantidos *overnight* à 4°C. No terceiro dia as células foram lavadas (3X por 10 minutos) em PBS + 1% BSA e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida com anticorpo secundário apropriado anti-mouse Alexa Fluor 593 1:750 (Thermo Fisher – Invitrogen) ou anti-cabra Alexa Flour 594 1:250 (Thermo Fisher – Invitrogen). Na sequência, as células foram novamente lavadas (3X por 10 min) em PBS + 1% BSA, incubadas por 5 min à temperatura ambiente com 10µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) em PBS. Após, foram lavadas em PBS (1x por 10 minutos), montadas em lâmina com PBS contendo 2,5% 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano-trietilenodiamina – DABCO (“anti fading”) e 50% glicerol - pH 7,2, seladas e analisadas em microscópio óptico de fluorescência Axio Imager M1 – Apotome, Zeiss.

3.4.2 Quantificação da interação *in vitro* de fibrócitos humanos por *L. amazonensis*

Para quantificação da interação, os fibrócitos com parasitos aderidos e interiorizados foram processados como descrito no item 3.4, as lamínulas foram fixados com Bouin, lavadas em álcool 70% e coradas ppor Giemsa. Foram realizados 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo e quantificadas 300 células por lamínula utilizando objetiva de 100x em microscópio óptico de campo claro (Zeiss Primo Star).

3.4.3 Processamento para microscopia eletrônica de varredura

Para observação da superfície dos fibrócitos e da sua interação com as promastigotas de *L. amazonensis*, nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 6 horas, foram fixadas por 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído em 0,1M tampão

cacodilato de sódio, pH 7,2 acrescido de 3,5% sacarose. Após esse tempo, as culturas foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 1h a 4°C com 1% tetróxido de ósmio (OsO₄) diluído em 0,1M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 1% ferricianeto. Após a pós-fixação as lamínulas foram lavadas em tampão 0,1M cacodilato de sódio – pH 7,2 e em seguida desidratadas em série de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo posteriormente secas em aparelho de ponto crítico (Autosondri – Geol - 815), metalizadas (Ted Pella Cressington - 108) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6390LV) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ.

3.4.4 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para análise morfológica dos fibrócitos, as células aderidas em garrafas de 25cm² infectados ou não, foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído por 1 hora à 4°C em tampão 0,1M cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 3,5% sacarose, lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas por 1h a 4°C com 1% OsO₄ diluído em tampão 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,2 com 1% ferricianeto e após lavadas em tampão 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,2. Em seguida, as células foram desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina PolyBed 812. Após a polimerização foram realizados cortes ultrafinos (ultramicrotomo Reichert OmU3), recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com 5% acetato de uranila e 1% citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC/FIOCRUZ.

3.4.5 Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Com o objetivo de avaliar a modulação da produção de citocinas por fibrócitos com promastigotas de *L. amazonensis* ou não, os sobrenadantes das culturas armazenados a -70°C (descrito no item 3.4) foram descongelados e a análise das concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , CCL-2 (MCP-1) e CXCL10 (IP-10) (eBioscience) foram avaliadas por ELISA, seguindo as orientações protocoladas pelo fabricante.

3.4.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para verificar a produção de óxido nítrico (NO) nas culturas primárias de fibrócitos com promastigotas de *L. amazonensis* ou não, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos nos diferentes intervalos de tempo descritos no item 3.4 e avaliados por ensaio colorimétrico onde as concentrações de NO foram calculadas através da razão dos níveis de Nitrito/Nitrato pelo kit "Nitric Oxide (NO₂/NO₃) detection kit" (Enzo Technology) utilizando filtro de 550nm em micro-leitor de ELISA (MDS Analytical Technologies).

3.4.7 Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)

Para determinar a atividade da desidrogenase láctica nas culturas primárias de fibrócitos infectados ou não foi utilizado o kit "LDH Liquiform" (Labtest), um ensaio colorimétrico que avalia a conversão de piruvato em lactato. Este catabolismo foi observado a partir da incubação de 100 µL do reagente de trabalho (Solução tampão à 250 mmol/L pH 7,5; piruvato de sódio 6 mmol/L, NADPH 360 µmol/L; azida sódica 0,095%) com 6 µL da amostra e incubação à 37°C por 1 minuto. Em seguida, foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro à 340nm, em intervalos de 2 minutos. O valor da atividade foi medido através da razão entre a leitura 1 e a leitura 2 multiplicado por 8095, o fator da reação (Conjunto de fatores obtidos sobre variáveis; fórmula = Volume total do ensaio x 1000/ absorvância milimolar do NADH [6,3] x Volume da amostra x espessura da solução [1cm]).

3.4.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o teste t-student não pareado e pela análise de variância unidirecional pareada (ANOVA) não paramétrico, Kruskal-wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A função "Enhanced Heat Map (heatmap.2) do pacote "gplots" R foi utilizada para gerar *heatmaps*.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica e fenotípica dos fibrócitos humanos

Os fibrócitos obtidos a partir da cultura primária de células mononucleares do sangue periférico humano, após 15 dias de cultivo, foram caracterizados com base em análises morfológicas através de diferentes técnicas de microscopia: óptica de campo claro, eletrônica de varredura, eletrônica de transmissão; e com base nas análises fenotípicas com as quais a identificação dos fibrócitos foi elaborada através das avaliações dos marcadores específicos CD45/HSP-47 por microscopia óptica de fluorescência.

A partir das análises das culturas primárias de fibrócitos por microscopia óptica de campo claro foram observadas células com estruturas características, apresentando formas alongadas e afiladas (Fig.6A). Em maior aumento evidenciamos o núcleo centralizado, e nucléolo aparente, além de diversos prolongamentos citoplasmáticos (Fig.6B). Estes dados foram confirmados pelas micrografias eletrônicas adquiridas por microscopia eletrônica de varredura nas quais observamos diversos prolongamentos citoplasmáticos do tipo filopódios (Fig.7A), além de uma região volumosa localizada no centro da célula, correspondendo, provavelmente, ao núcleo celular (Fig.7B).

A análise ultraestrutural de fibrócitos feita por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que estas células apresentam o citoplasma rico em organelas (Fig.8A-D). Ao longo da superfície das células foram observadas diversas projeções citoplasmáticas, do tipo filopódios, confirmando os resultados obtidos por microscopia óptica de campo claro e eletrônica de varredura (Fig.8A-B). Por toda célula foi possível observar diversas mitocôndrias sendo estas caracterizadas pela presença de dupla membrana e cristas bem definidas, além de perfis de retículo endoplasmático que em sua maioria apresentava-se rugoso contendo polirribossomos aderidos (Fig.8C-D). Foi ainda observado o núcleo arredondado, contendo heterocromatina periférica densa, envoltório nuclear e os poros (Fig.8D).

A caracterização fenotípica dos fibrócitos humanos foi realizada por microscopia de fluorescência através de dois ensaios utilizando a identificação de três principais marcadores: CD45 (proteína pan-leucocitário), anti-colágeno tipo I (proteína de matriz) e HSP-47 (proteína de choque térmico envolvida na síntese de

colágeno tipo I e presente especificamente no retículo endoplasmático das células produtoras desta proteína). No primeiro ensaio foi utilizada a dupla marcação do CD45 / colágeno tipo I (Fig.9 A-D), assim como a marcação do núcleo (DAPI) (Fig. 9 A), uma intensa marcação em vermelho que identificou a expressão da proteína CD45 distribuída por toda a porção externa da membrana plasmática dos fibrócitos (Fig.9B). A marcação em verde identificou o colágeno tipo I produzido pelos fibrócitos (Fig.9C), porém não exportado, ainda compartimentalizado no citoplasma, sendo mais intensa esta marcação na região próxima ao núcleo. Sobrepondo as imagens foi possível observar a co-localização anti-CD45 / colágeno tipo I (Fig.9D). No segundo ensaio, foi utilizada a dupla marcação de anti-CD45 / HSP-47. Neste, evidenciamos a marcação em verde que identificou as moléculas CD45 distribuídas por toda a superfície celular (Fig.10B) e marcação em vermelho identificando o HSP-47 distribuídas com intensidade no retículo endoplasmático disperso pelo citoplasma do fibrócito (Fig.10C). Sobrepondo as imagens foi possível observar a co-localização de CD45 / HSP- 47 (Fig.10D).

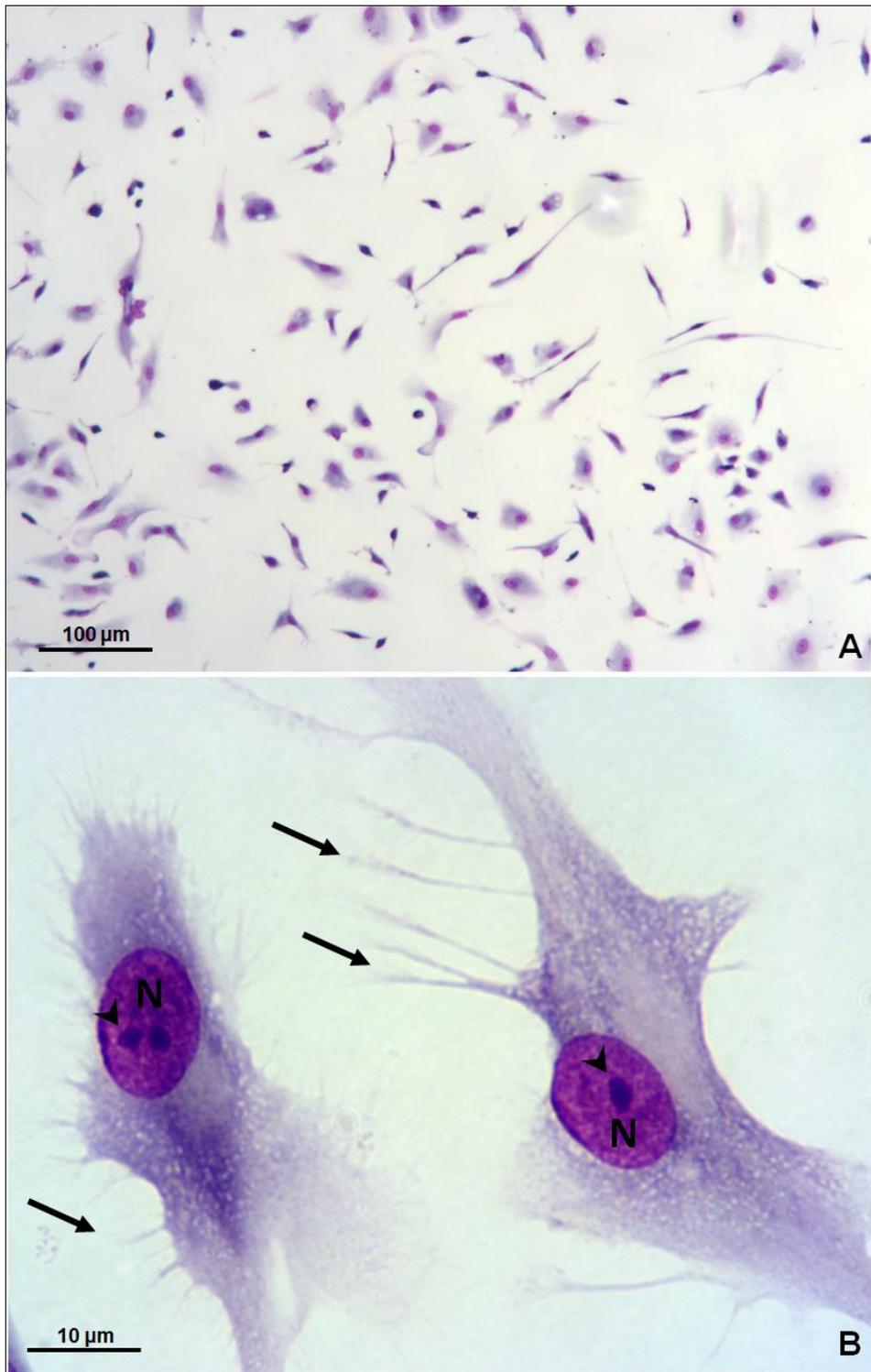


Figura 6: (A-B): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia óptica de campo claro.

A: Visão geral da cultura primária de fibrócitos humanos após 15 dias de cultivo, mostrando um número maior de células alongadas com projeções citoplasmáticas, em aumento; **B:** Células alongadas e finas com projeções citoplasmáticas (→), núcleo (N) e nucléolo aparente (▶).

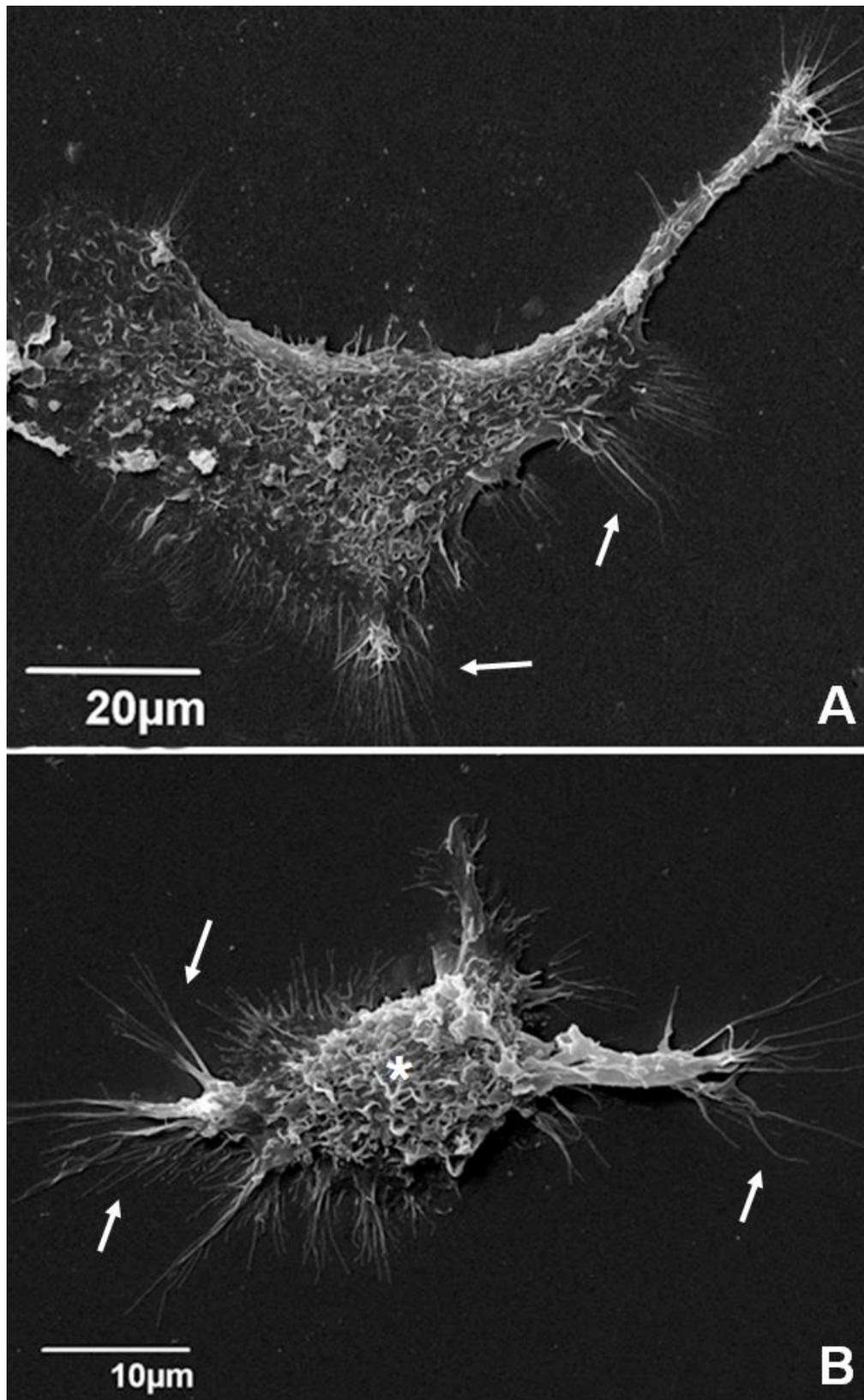


Figura 7: (A-B): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de varredura.

A e B: Fibrócitos humanos apresentando morfologia alongada e fina com diversas projeções citoplasmáticas (→). B: Grande volume da região central do fibrócito, correspondente a localização do núcleo da célula (*).

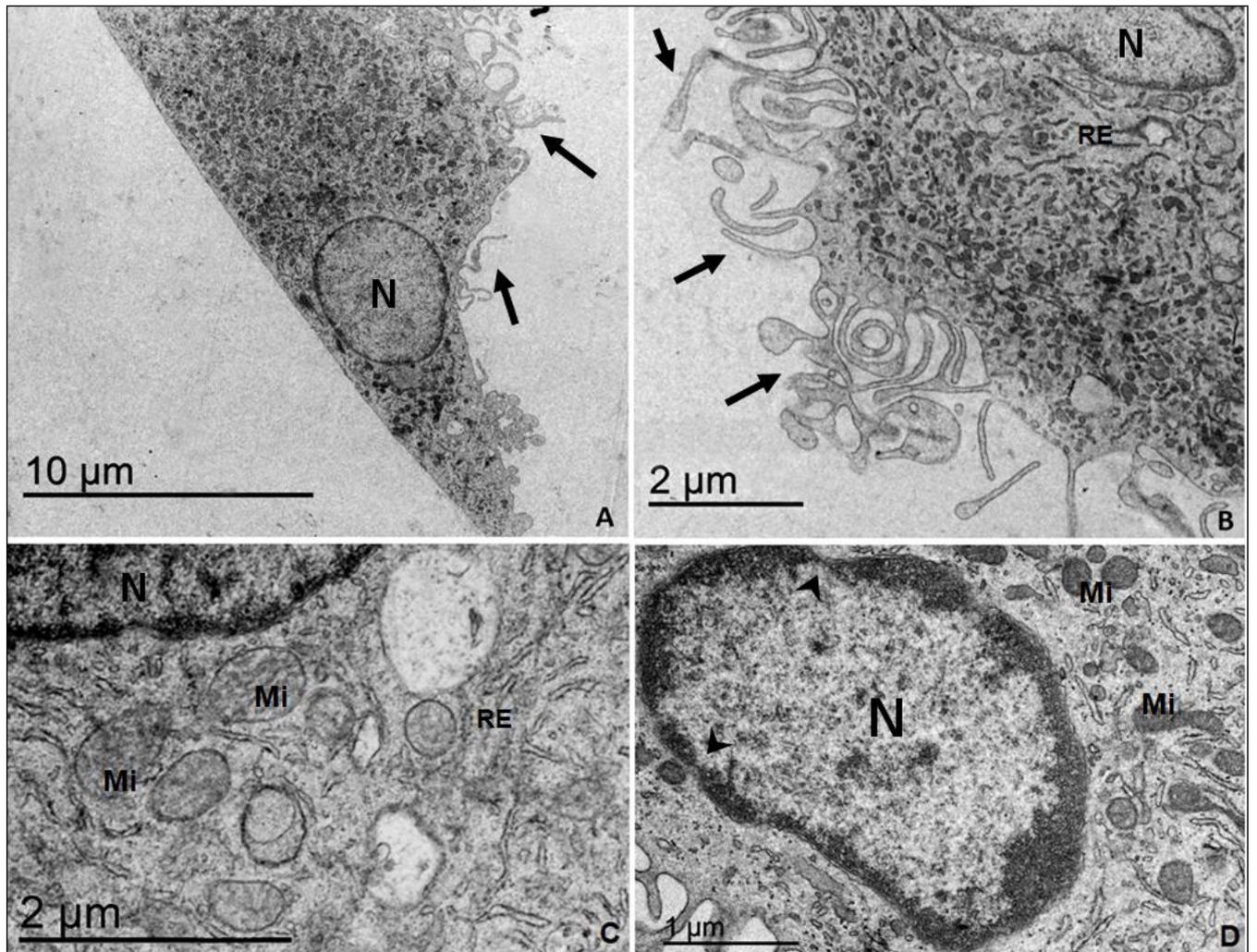


Figura 8: (A-D): Caracterização ultraestrutural da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão.

A: Micrografia eletrônica mostrando morfologia geral do fibrócitos onde se evidencia o núcleo (N) e citoplasma rico em organelas. **B:** diversos prolongamentos citoplasmáticos (→); **C:** perfis de retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria (Mi); **D:** Em detalhe, núcleo (N) com cromatina periférica, mitocôndrias (Mi), retículo endoplasmático (RE) e poros nucleares (▶).

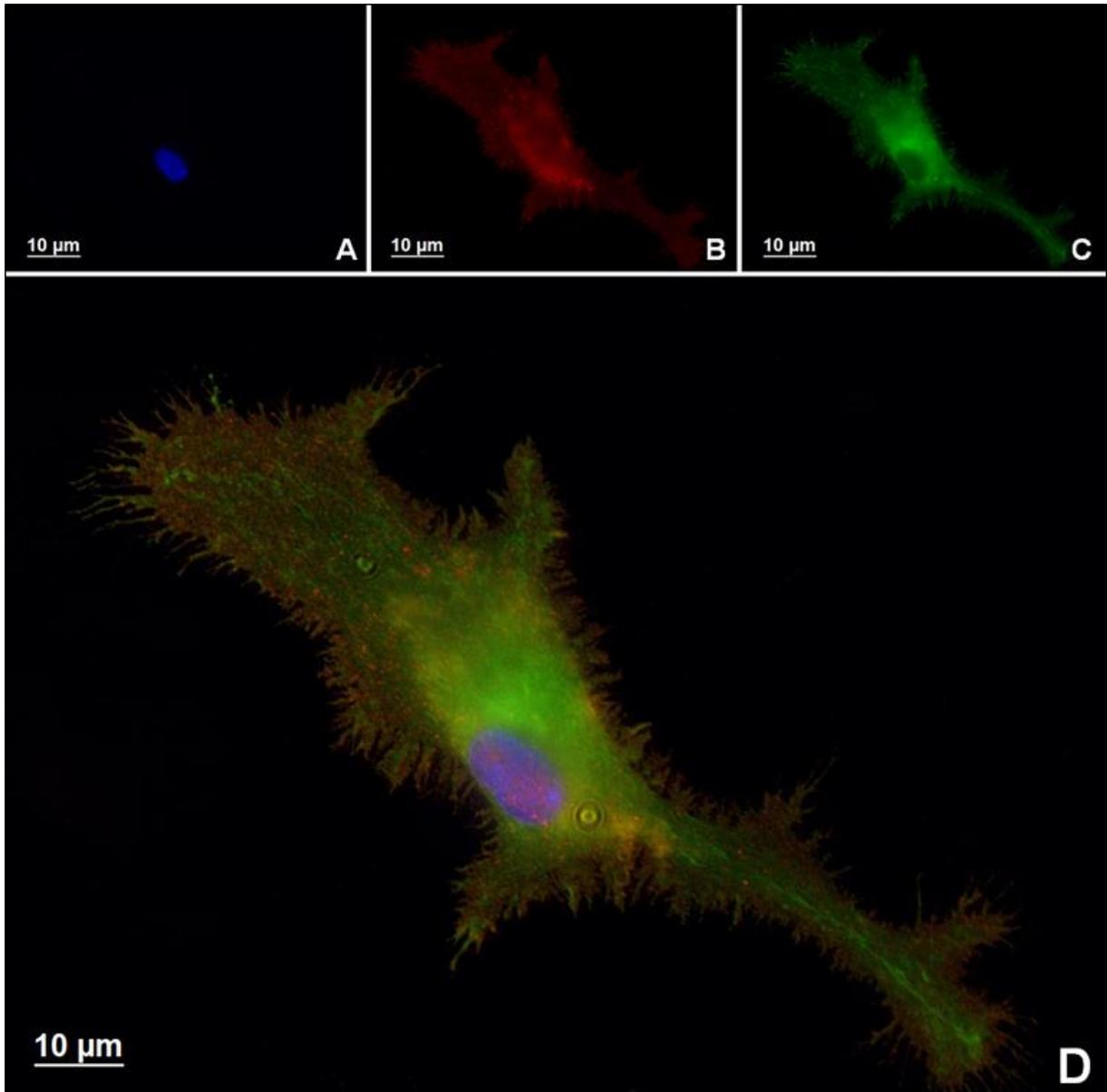


Figura 9: (A-D): Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos utilizando marcação dupla – CD45 / Colágeno tipo I por microscopia de fluorescência.

A e D: Marcação do núcleo com 4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI (azul). **B:** CD45 Alexa Fluor 594 (vermelho). **C:** anti-colágeno tipo I Alexa Fluor 488 (verde). **D:** Sobreposição das imagens (Merge).

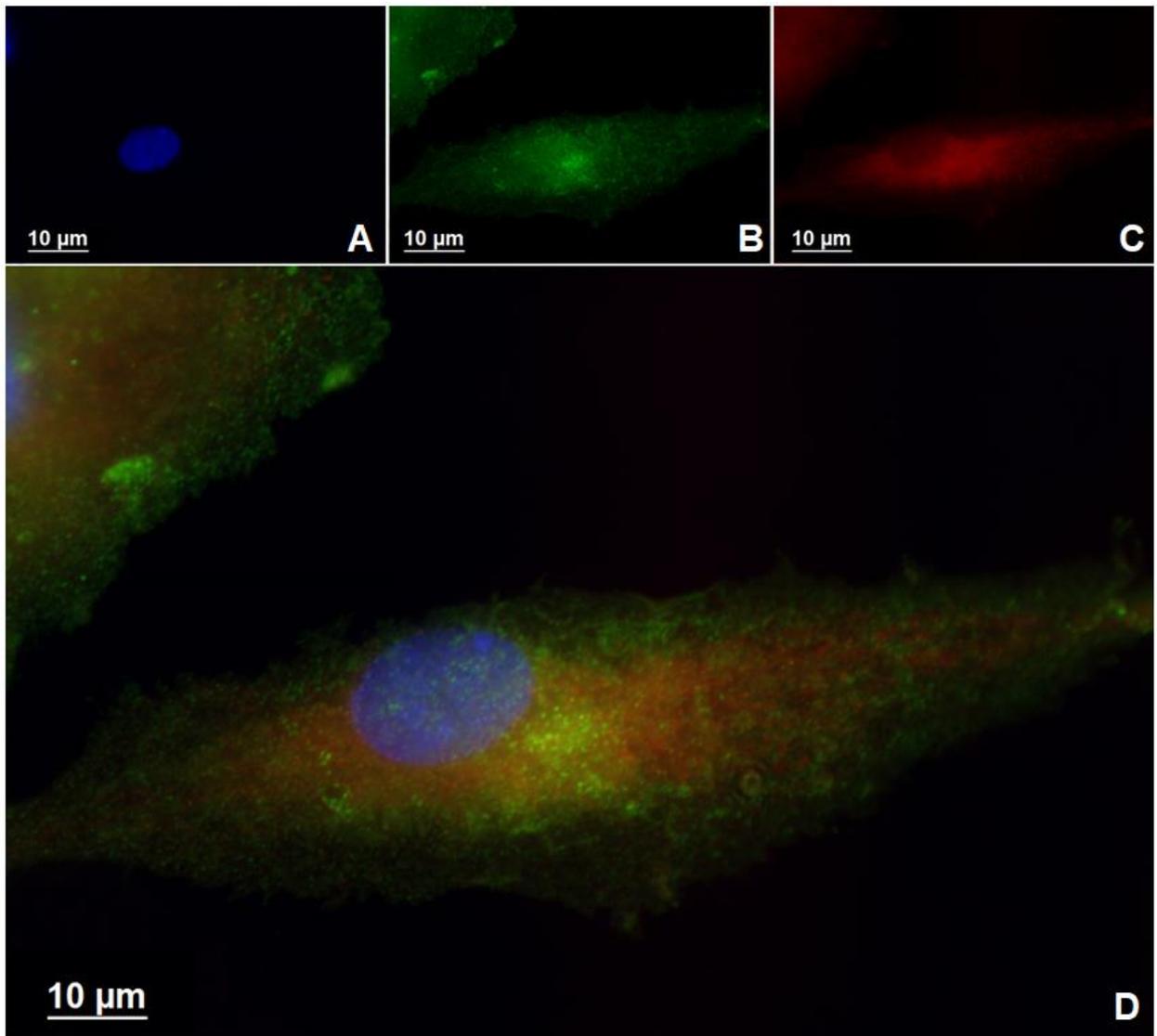


Figura 10: (A-D): Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos utilizando marcação dupla – CD45 / HSP-47 por microscopia de fluorescência. A e D: Marcação do núcleo com 4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI (azul). B: CD45 Alexa Fluor 488 (verde). C: HSP47 Alexa Fluor 594 (vermelho). D: anti-CD45 Alexafluor 488 / HSP47 Alexafluor 594 (Merge).

4.2 Análise da interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*

A análise quantitativa dos fibrócitos humanos com *L. amazonensis*, mostrou que os fibrócitos são capazes de reconhecer e internalizar rapidamente as promastigotas de *L. amazonensis*. Após 2 horas de infecção, cerca de $36\% \pm 15$ (desvio padrão) dos fibrócitos apresentavam parasitos aderidos à superfície (Fig.11 e 12A) e $50\% \pm 10$ dos fibrócitos apresentavam parasitos recém-endocitados na forma promastigota (Fig.13). As promastigotas foram observadas no interior de vacúolos parasitóforos estreitos, no qual posteriormente ocorreu a conversão destas para a forma amastigota (Fig.12A). A partir de 6 horas de infecção observamos uma redução significativa para $11\% \pm 4$ de fibrócitos com parasitos aderidos (Fig.11 e 12B) e um aumento significativo para $67\% \pm 11$ de fibrócitos com parasitos internalizados (Fig.12B e 13). A presença de amastigotas aderidas na parede interna de grandes vacúolos parasitóforos foi observada a partir de 24 horas de infecção (Fig.12C-I). O percentual de células com parasitos se manteve constante no período entre 24 horas a 10 dias de infecção, não tendo sido observadas grandes variações. No entanto, após 15 dias de interação houve uma redução significativa no percentual quando comparado ao tempo de 10 dias ($22\% \pm 6$ em 15 dias versus $48\% \pm 9$ em 10 dias) (Fig.13).

A diferenciação das promastigotas em amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos foi observada a partir de 6 horas de infecção. Contudo, após 24 horas de interação conseguimos evidenciar a multiplicação das amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos (Fig.12C-J). Com base nesse evento fizemos a quantificação do número total de amastigotas por fibrócitos nos diferentes tempos da cinética, e fizemos uma média dessa contagem para saber quantas amastigotas se encontravam em cada fibrócito infectado. Verificamos uma similaridade no período compreendido entre tempos de 24 e 144 horas de infecção, porém após 10 dias de infecção ocorreu um pequeno aumento e em 15 dias de infecção foi possível observar um aumento significativo da multiplicação de amastigotas em comparação aos tempos iniciais apresentando grau de significância quando comparado, por exemplo, a 48 horas de infecção (Fig.14).

A partir de 48 horas observamos alguns fibrócitos em estado de degradação (com o núcleo aparentemente intacto, mas com o citoplasma se degradando) contendo amastigotas tanto fora, quanto dentro da célula (Fig.15A-G). Com base neste evento, constatamos a diminuição expressiva do número de fibrócitos

humanos em 15 dias de interação (Fig.16F) em comparação aos outros tempos (Fig.16A-E).

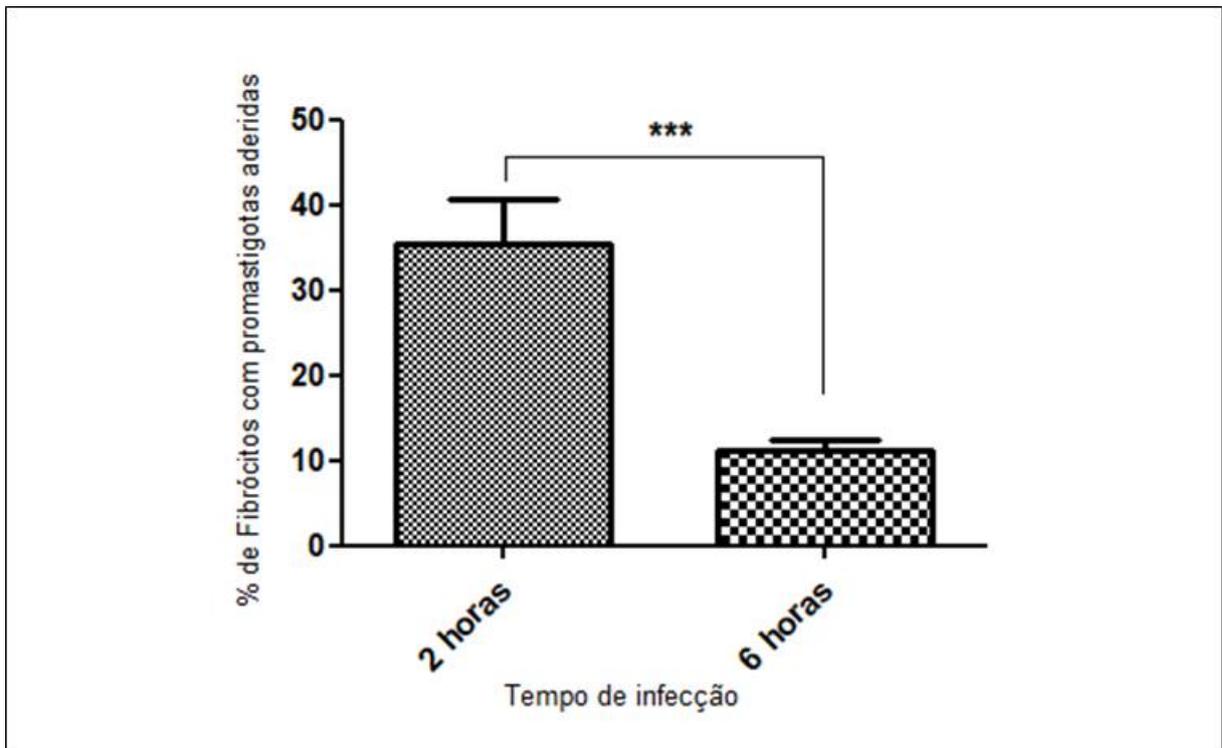


Figura 11: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos contendo promastigotas de *L. amazonensis* aderidas.

Resultados obtidos através da média aritmética da contagem de 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo, nas quais foram quantificadas 300 células por lamínula em microscópio óptico de campo claro. *** $p < 0.001$, Teste *Student's T test* não pareado.

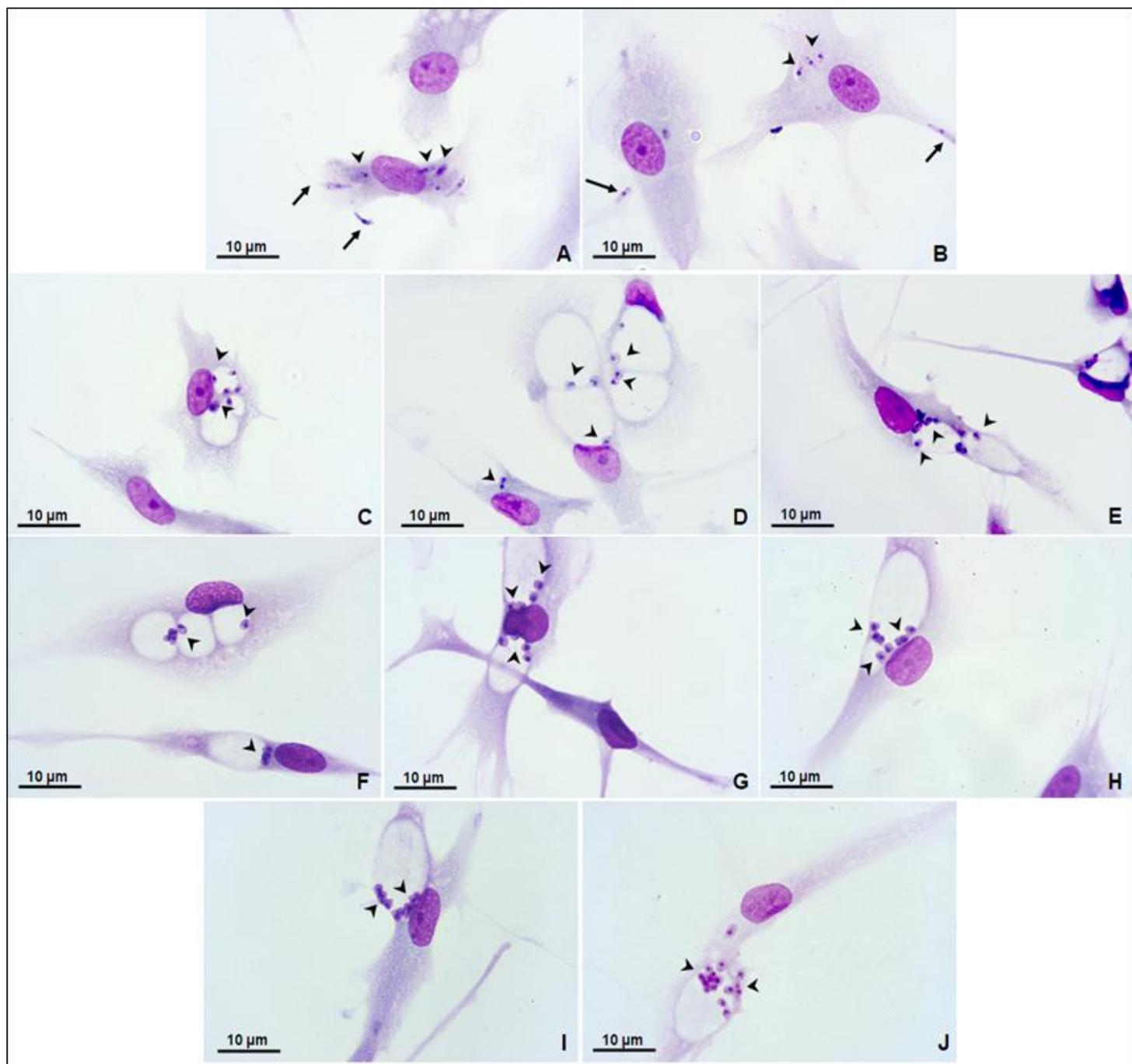


Figura 12 (A-J): Análise da interação das culturas primárias de fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis*.

A: Fibrócitos após 2 horas de interação apresentando parasitos aderidos (→) e internalizados (▶). **B:** após 6 horas de interação observa-se poucos parasitos aderidos (→) e parasitos íntegros dentro de vacúolos parasitóforos estreitos (▶). **C:** Fibrócitos após 24 horas de interação, contendo amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos dilatados (▶). **D:** Após 48 horas de interação observa-se parasitos aderidos na parede dos vacúolos parasitóforos e a sua multiplicação, o mesmo verificado em **E:** 72 horas, **F:** 96 horas, **G:** 120 horas, **H:** 144 horas, **I:** 10 dias, **J:** com um aumento da multiplicação em 15 dias de interação (▶).

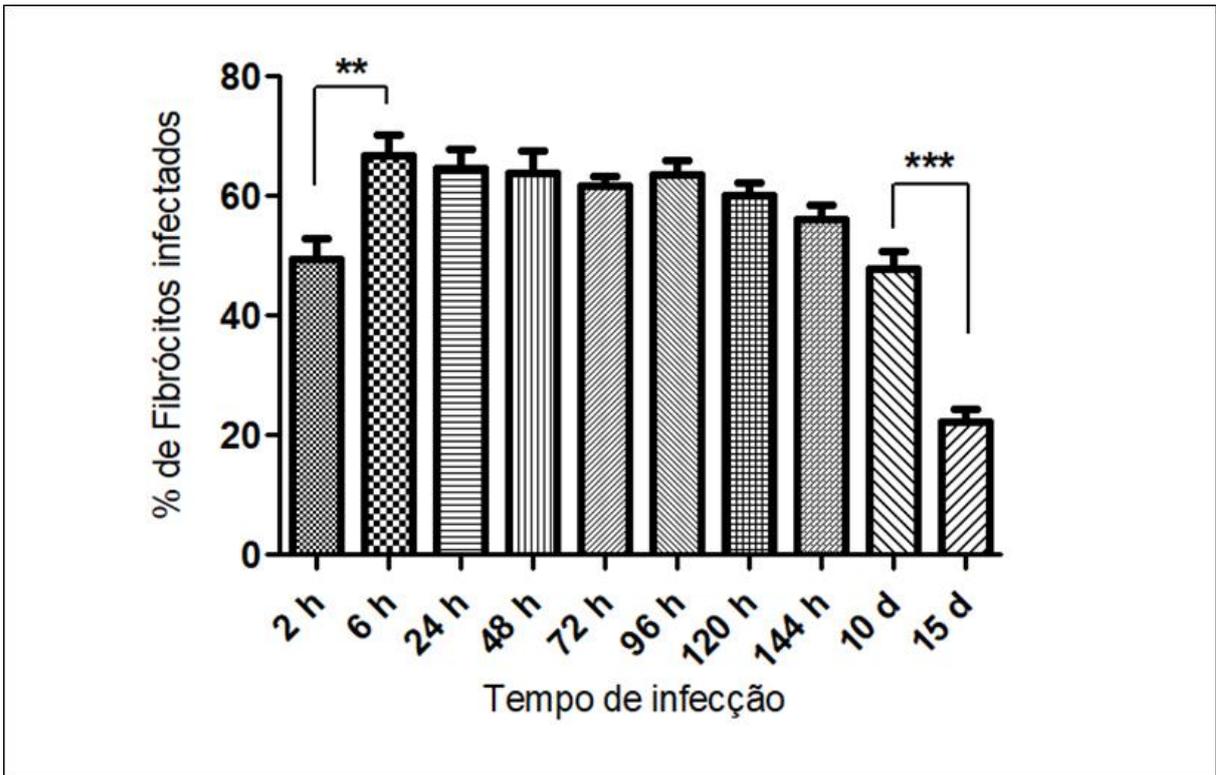


Figura 13: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos com *L. amazonensis* internalizadas.

Resultados obtidos através da média contagem de 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo, nas quais foram quantificadas 300 células por lamínula em microscópio óptico de campo claro. ** $p < 0.001$ / *** $p < 0.001$, Teste ANOVA One Way – Kruskal-Wallis, não pareado.

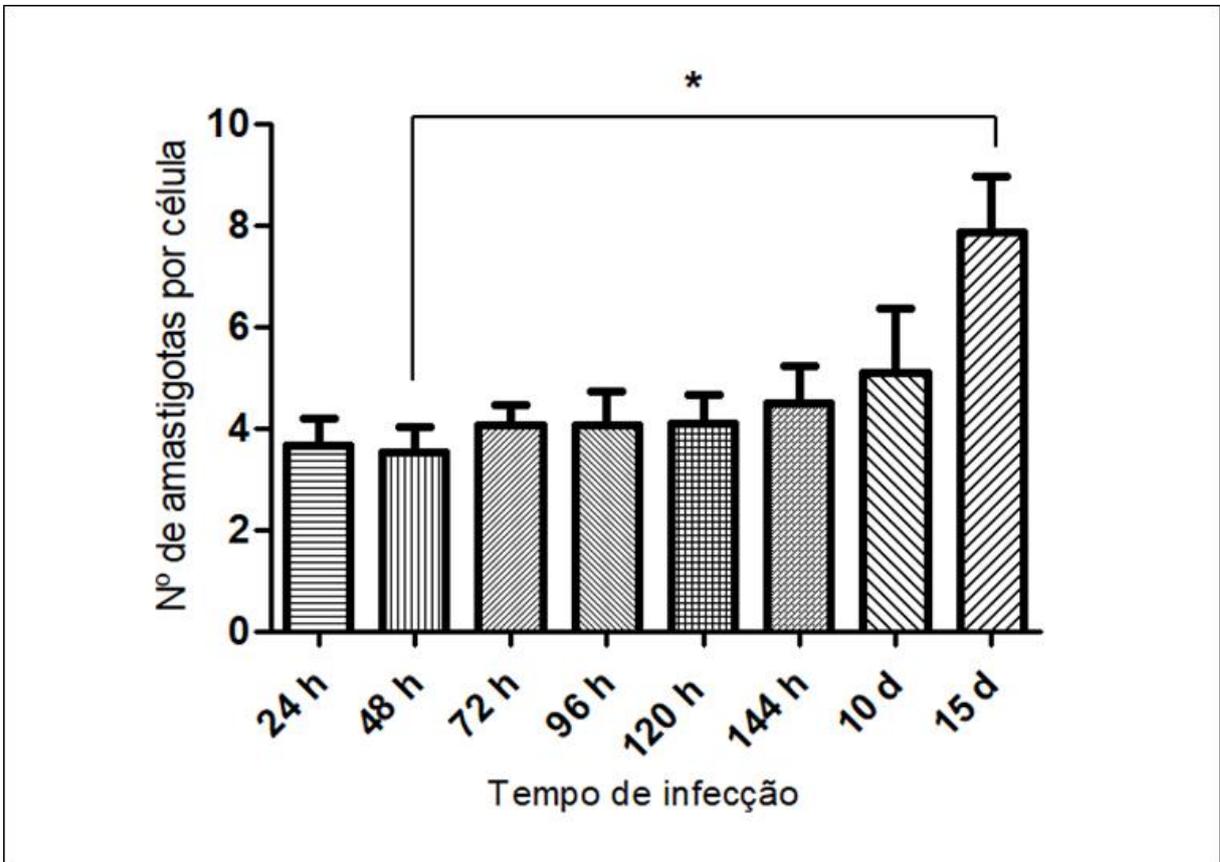


Figura 14: Gráfico referente ao número total de amastigotas de *L. amazonensis* em fibrócitos humanos.

Valores médios referentes a contagens de 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo do número total de amastigotas de *L. amazonensis* por fibrócitos infectados analisados por microscopia óptica de campo claro. * $p < 0.05$, Teste ANOVA One Way – Kruskal-Wallis, não pareado.

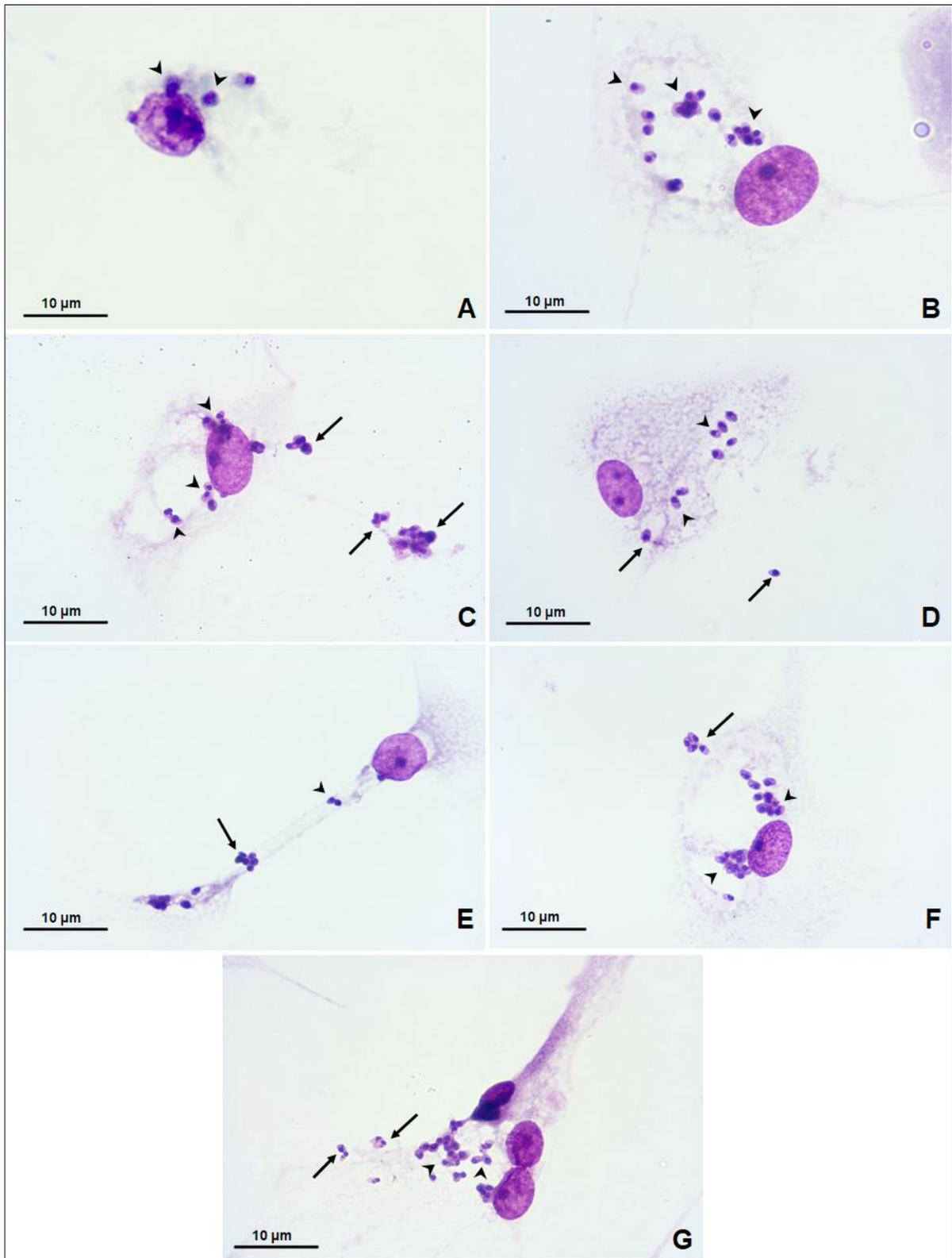


Figura 15 (A-G): Análise de fibrócitos em degradação com *L. amazonensis*.

A: Fibrócitos com parasitos nos tempos 48 horas, **B:** 72 horas, **C:** 96 horas, **D:** 120 horas, **E:** 144 horas, **F:** 10 dias e **G:** 15 dias em processo de liberação do conteúdo citoplasmático contendo amastigotas no interior de vacúolos (→) e do lado de fora da célula (➤).

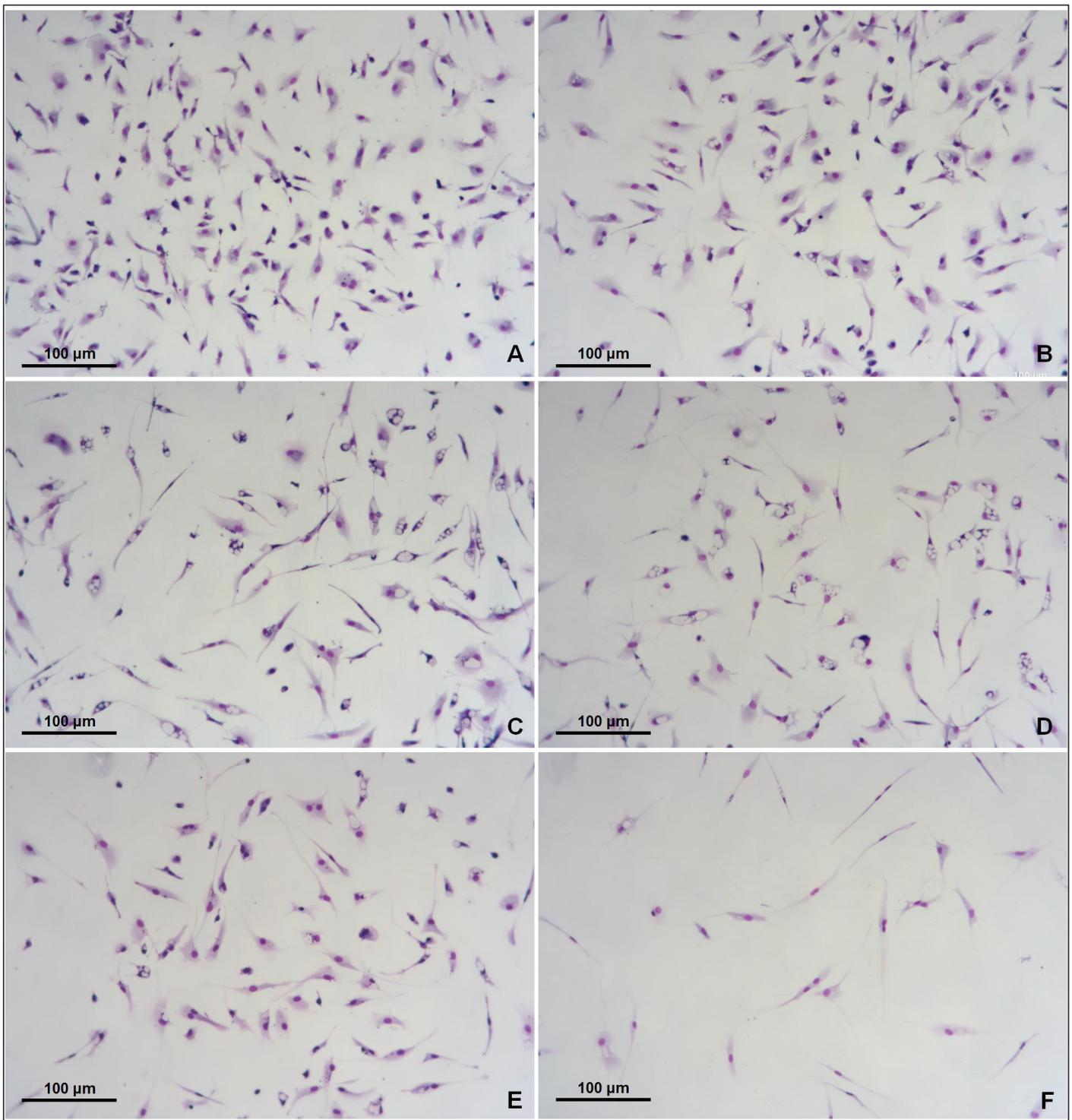


Figura 16 (A-F) Análise da diminuição do número de fibrócitos com *L. amazonensis* internalizados.

A: Fibrócitos com 2 horas, **B:** 24 horas, **C:** 72 horas, **D:** 120 horas, **E:** 10 dias e **F:** 15 dias horas de interação aderidos em lamínulas.

4.2.1 Análise quantitativa de fibrócitos contendo amastigotas de *L. amazonensis* aderidas na superfície celular

A partir da avaliação da interação dos fibrócitos com as promastigotas de *L. amazonensis* verificamos a multiplicação do número de amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos e evidenciamos a presença de amastigotas livres com início em 48 horas após a interação até o final da cinética em 15 dias (Fig.17B e G). Nestes ensaios, ressaltamos a presença de amastigotas aderidas à superfície celular dos fibrócitos humanos no mesmo período da análise (Fig.17 A-G). Essas observações nos levaram a quantificar o número de amastigotas aderidas em cada célula e verificamos que no tempo de 48 horas foram observados amastigotas aderidas (3%). Após 72 horas ocorreu um aumento significativo para aproximadamente 7%, que pouco variou até 96 horas com 6%. No entanto ocorreu um aumento para 9% após 120 horas de interação, que se manteve até 144 horas. Contudo, evidenciamos uma expressiva diminuição a partir de 10 dias passando para 7% que se prolongou até 15 dias de interação chegando a 4% dos fibrócitos contendo amastigotas aderidas na superfície celular (Fig.18).

4.2.2 Análise fenotípica de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*

Para verificar se a interação dos fibrócitos com *L. amazonensis* promoveria uma mudança no padrão fenotípico destas células, uma vez que não se encontravam em fase final de diferenciação, foi realizada a análise fenotípica das culturas com parasitos através da identificação da presença dos marcadores específicos (CD45/HSP-47) ao longo da cinética. Os resultados mostram que nos tempos iniciais de 2 horas e 24 horas, bem como no tempo de 144 horas e nos tempos finais de 10 dias e 15 dias, a expressão das moléculas CD45 e HSP-47 não sofreram alterações nos fibrócitos humanos com *L. amazonensis* (Fig.19).

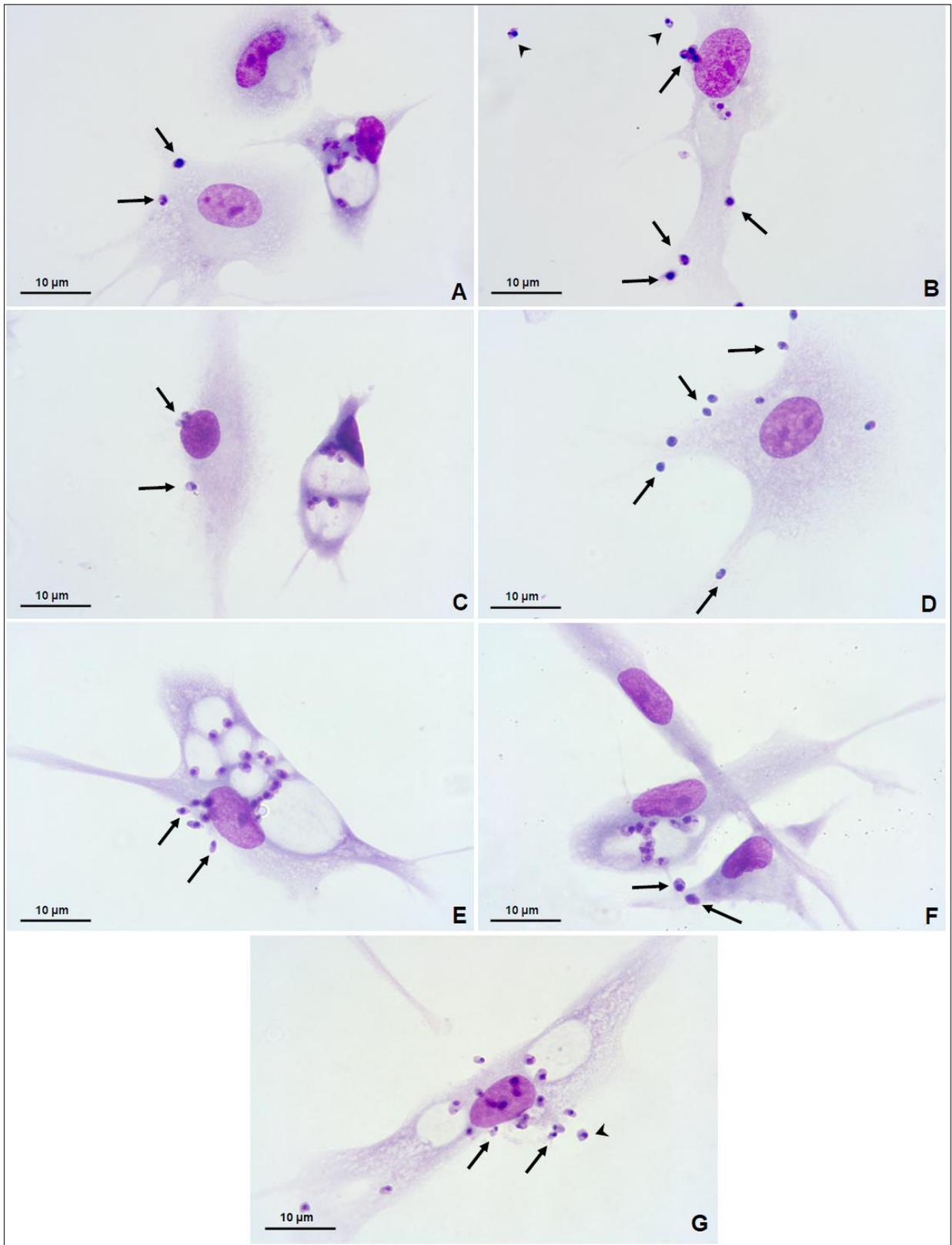


Figura 17 (A-G): Análise de fibrócitos humanos contendo amastigotas de *L. amazonensis* aderidas na superfície celular.

A: 48 horas, **B:** 72 horas, **C:** 96 horas, **D:** 120 horas, **E:** 144 horas, **F:** 10 dias, **G:** 15 dias de interação contendo amastigotas livres no meio de cultivo (▶) e amastigotas aderidas na superfície celular de fibrócitos humanos (→).

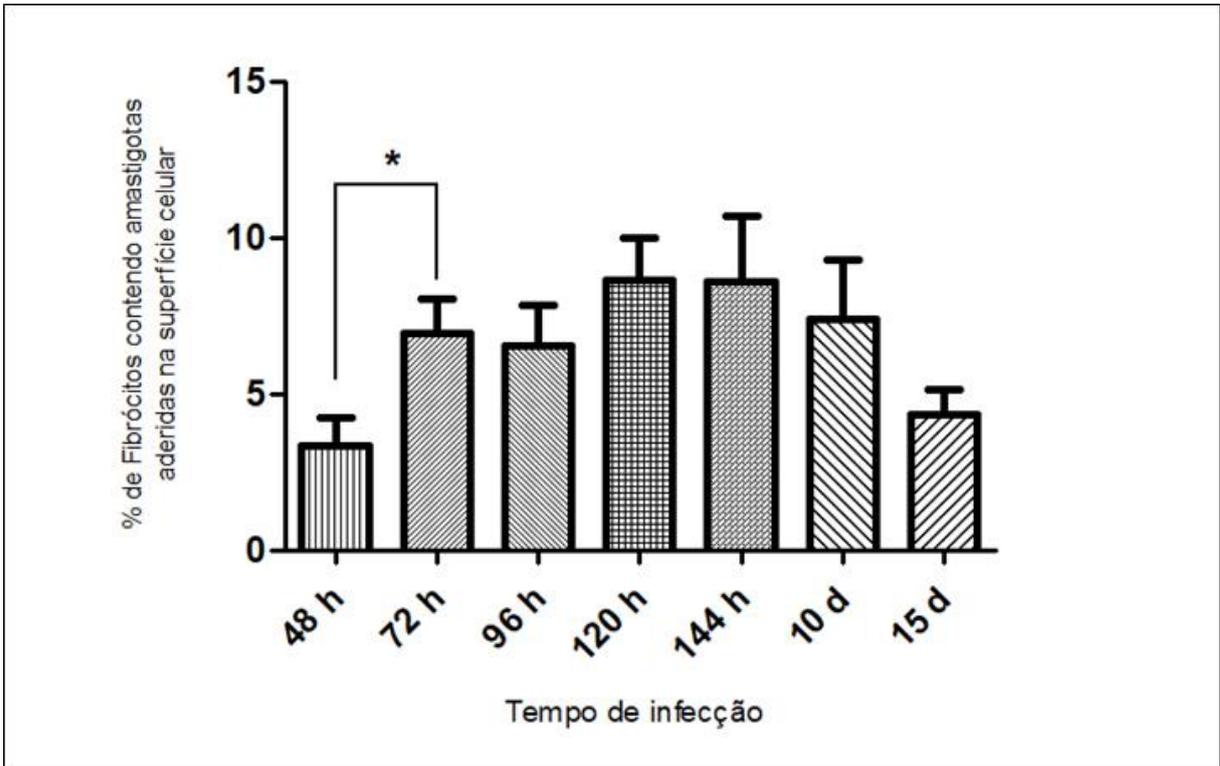


Figura 18: Gráfico do percentual de fibrócitos humanos contendo amastigotas de *L. amazonensis* aderidas na superfície celular

Resultados obtidos através da média da contagem de 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo ao longo da cinética, nas quais foram quantificadas 300 células por lamínulas e analisadas por microscopia óptica de campo claro. * $p < 0.05$, Teste *Student's T test* não pareado.

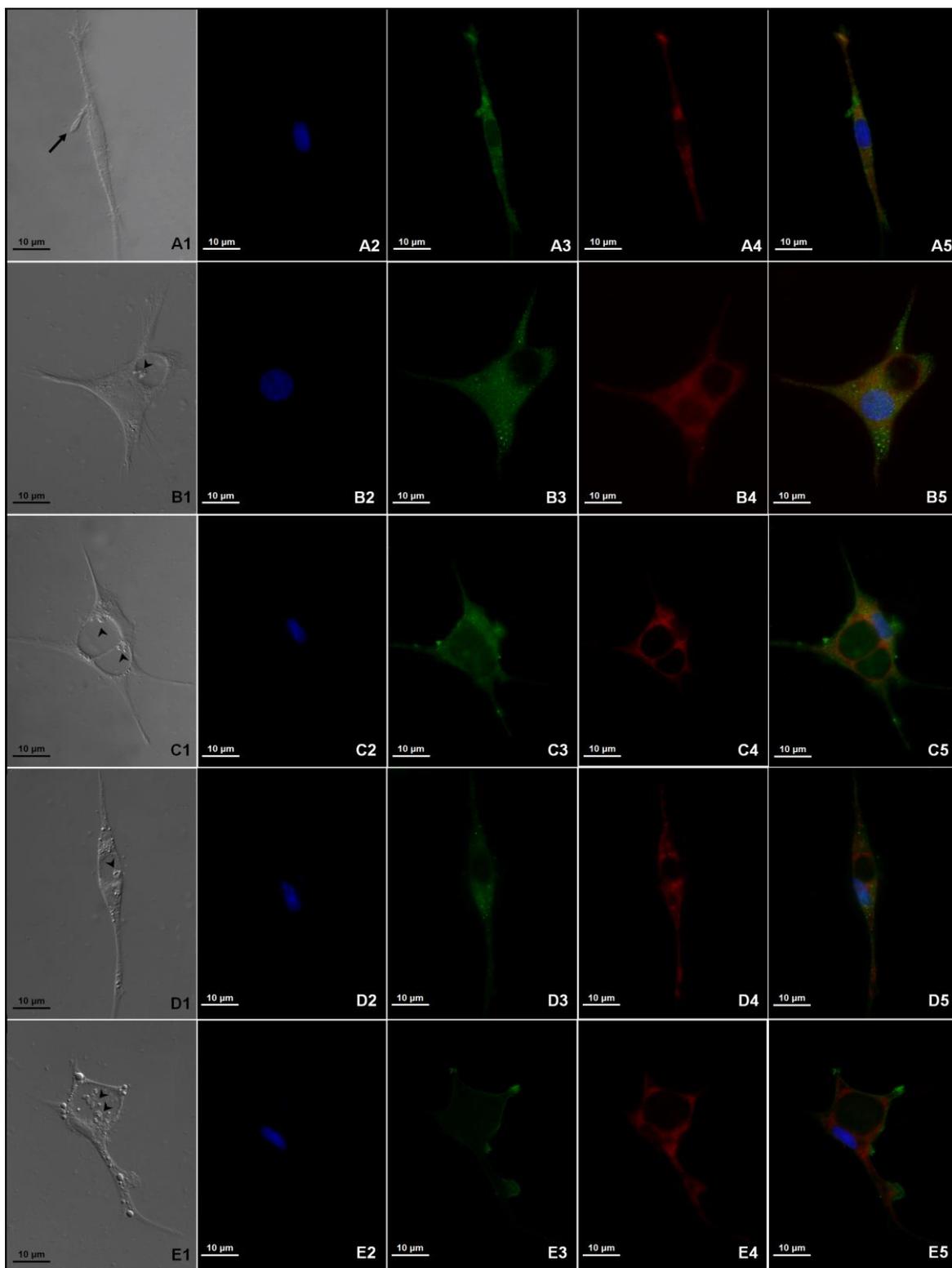


Figura 19 (A1-E5): Caracterização fenotípica dos fibrócitos durante a cinética de interação com *L. amazonensis* por microscopia de fluorescência.

A1-A5: Após 2 horas, **B1-B5** 24 horas, **C1-C5:** 144 horas, **D1-D5:** 10 dias e **E1-E5:** 15 dias de interação, apresentando marcação para DAPI (azul), CD45-Alexafluor 488 (verde), HSP47-Alexafluor 594 (vermelho); **A1-E1:** Contraste diferencial interferencial (DIC) do mesmo campo visual. **A5-E5:** Sobreposição das imagens.

4.3 Análise ultraestrutural da interação de fibrócitos com *L. amazonensis*

Para avaliarmos a interação dos fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis*, realizamos análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura convencional e eletrônica de transmissão.

Nas análises por microscopia eletrônica de varredura, utilizamos os tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 6 horas de infecção para evidenciar os primeiros momentos da interação parasito-célula hospedeira. Desta forma, verificamos que durante o processo de adesão, promastigotas do parasito aderiram às projeções citoplasmáticas dos fibrócitos tanto pelo corpo quanto pelo flagelo não havendo uma orientação espacial preferencial (Fig.20A-B; Fig.21A-B). Nesta interação, observamos que os fibrócitos são capazes de emitir expansões ou prolongamentos celulares e interagem com as promastigotas (Fig.20A).

A análise por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que após 2 horas de interação, os fibrócitos emitem prolongamentos citoplasmáticos que envolvem os parasitos, para que ocorra a fagocitose (Fig.22A). Após, foram observadas amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos estreitos, podendo observar a membrana, do parasito e do vacúolo, (Fig.22B). Em amastigotas recém endocitadas foi possível observar microtubulos subpeliculares e vesículas próximas ao vacúolo parasitóforo, pressupondo a fusão destas e posterior liberação do seu conteúdo para o interior do vacúolo parasitóforo (Fig.22C). Em 6 horas de interação observamos promastigotas em vacúolo parasitóforo estreito próximo ao núcleo, apresentando flagelo exteriorizado (Fig.23A). Com 24 horas de infecção, foram observadas amastigotas no interior de vacúolo parasitóforo e próximo, foi observado perfil de retículo endoplasmático rugoso (Fig.23B). Após 48 horas, verificamos que as amastigotas permaneciam no interior de vacúolos parasitóforos bem distendidos quando comparados aos vacúolos observados no tempo anterior (Fig.23C). A análise da cinética de infecção revelou que durante o curso o vacúolo parasitóforo aumenta de tamanho e, mesmo após 15 dias de infecção, além disso, observamos perfis de retículo endoplasmático rugoso (Fig.23 D-I). É importante salientar que em nenhum ponto da cinética avaliado por microscopia eletrônica de transmissão observamos alterações na morfologia do parasito. As promastigotas não tiveram dificuldade para serem fagocitadas e tampouco a célula ofereceu resistência para controlar a sua conversão para a forma amastigota e a multiplicação desta forma no interior dos vacúolos parasitóforos.

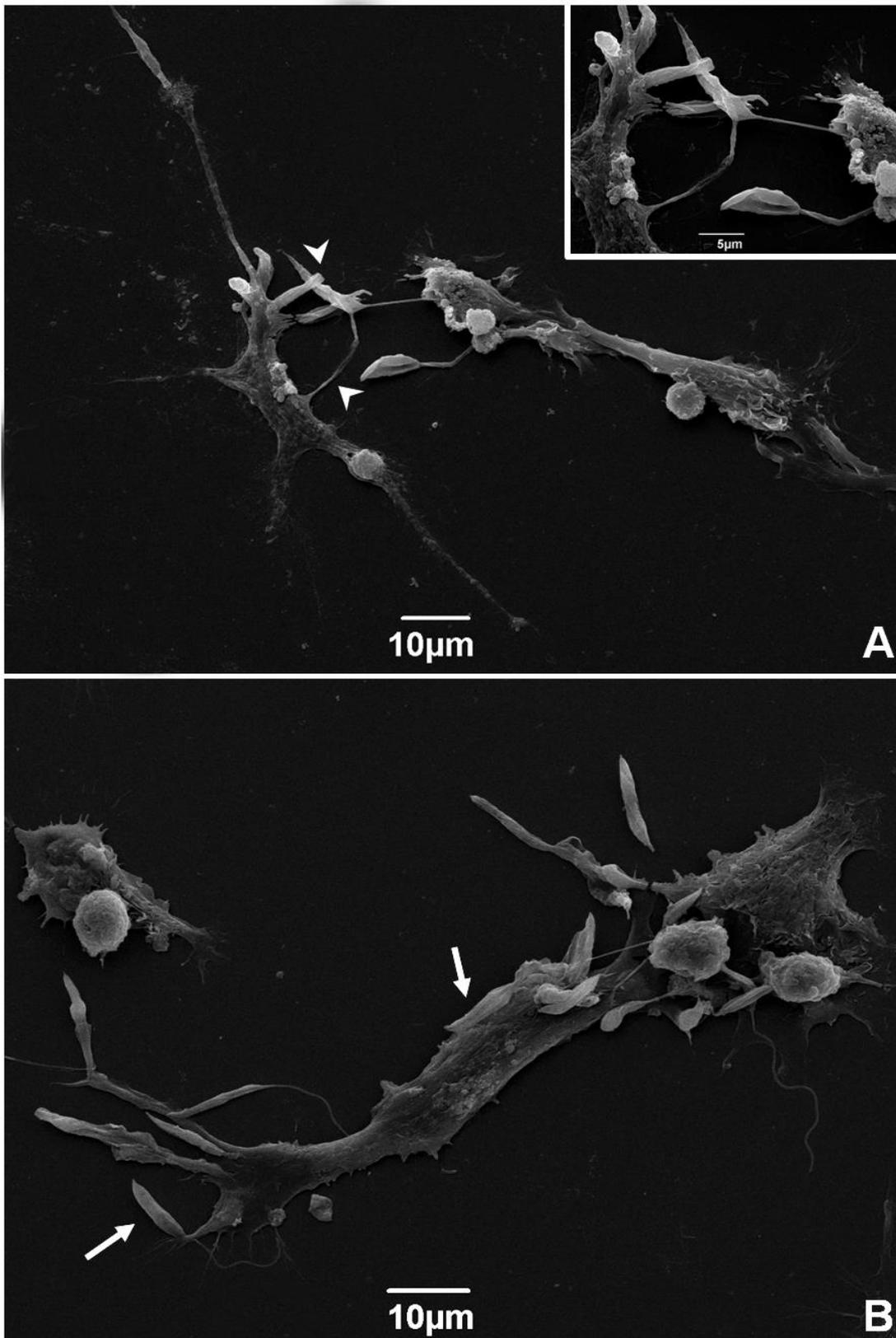


Figura 20 (A-B): Micrografias eletrônicas de varredura da interação de fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis*.

A: 30 minutos, **B:** 1 hora de interação, mostrando a adesão das promastigotas, tanto pelo flagelo quanto pelo corpo do parasito (→) e os fibrócitos humanos emitindo longos prolongamentos citoplasmáticos aumentando assim, o seu contato com o parasito (▶).

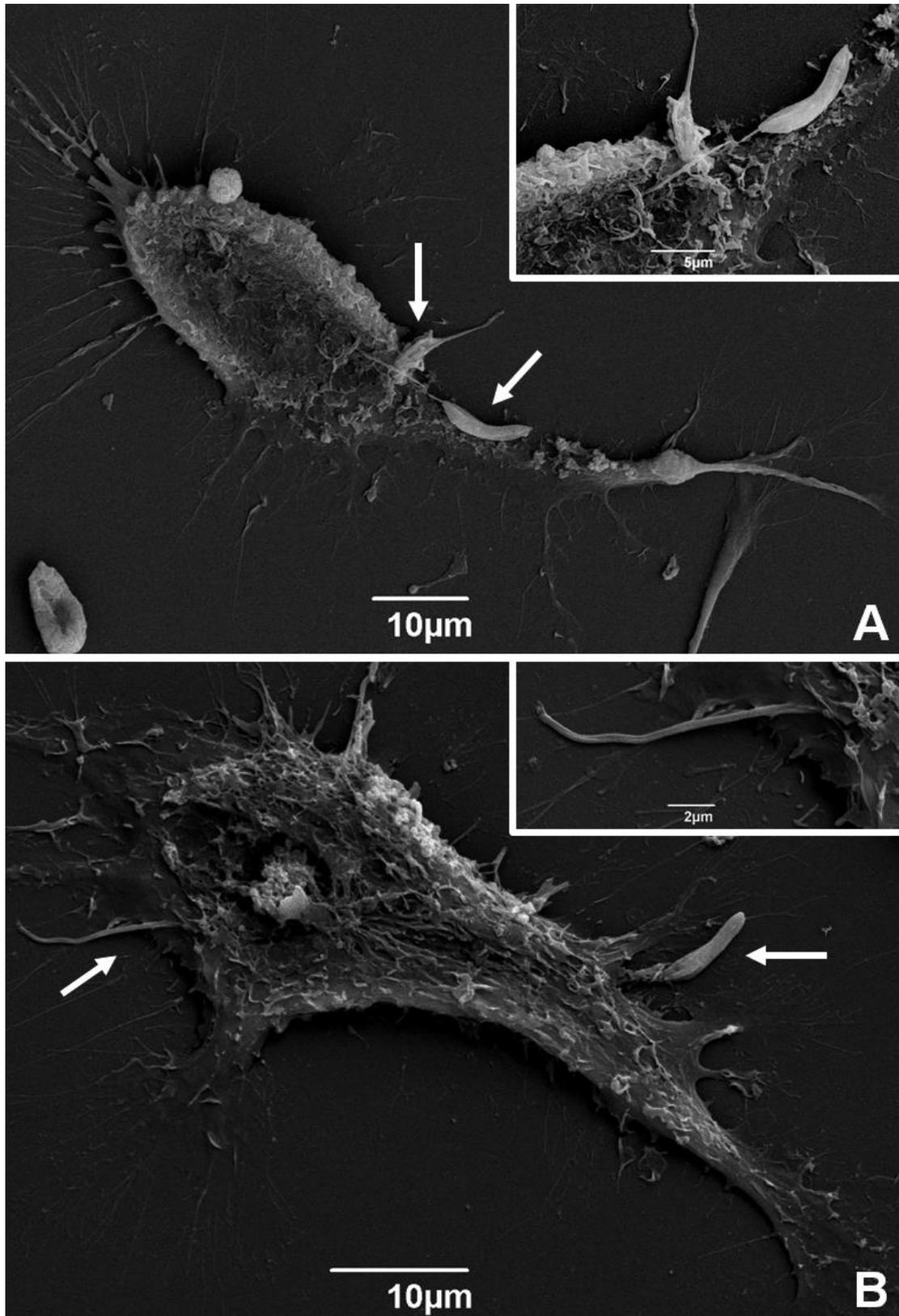


Figura 21 (A-B): Micrografias eletrônicas de varredura da interação de fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis*.

A: 2 horas e **B:** 6 horas de interação, mostrando a adesão das promastigotas, tanto pelo flagelo quanto pelo corpo do parasito (→).

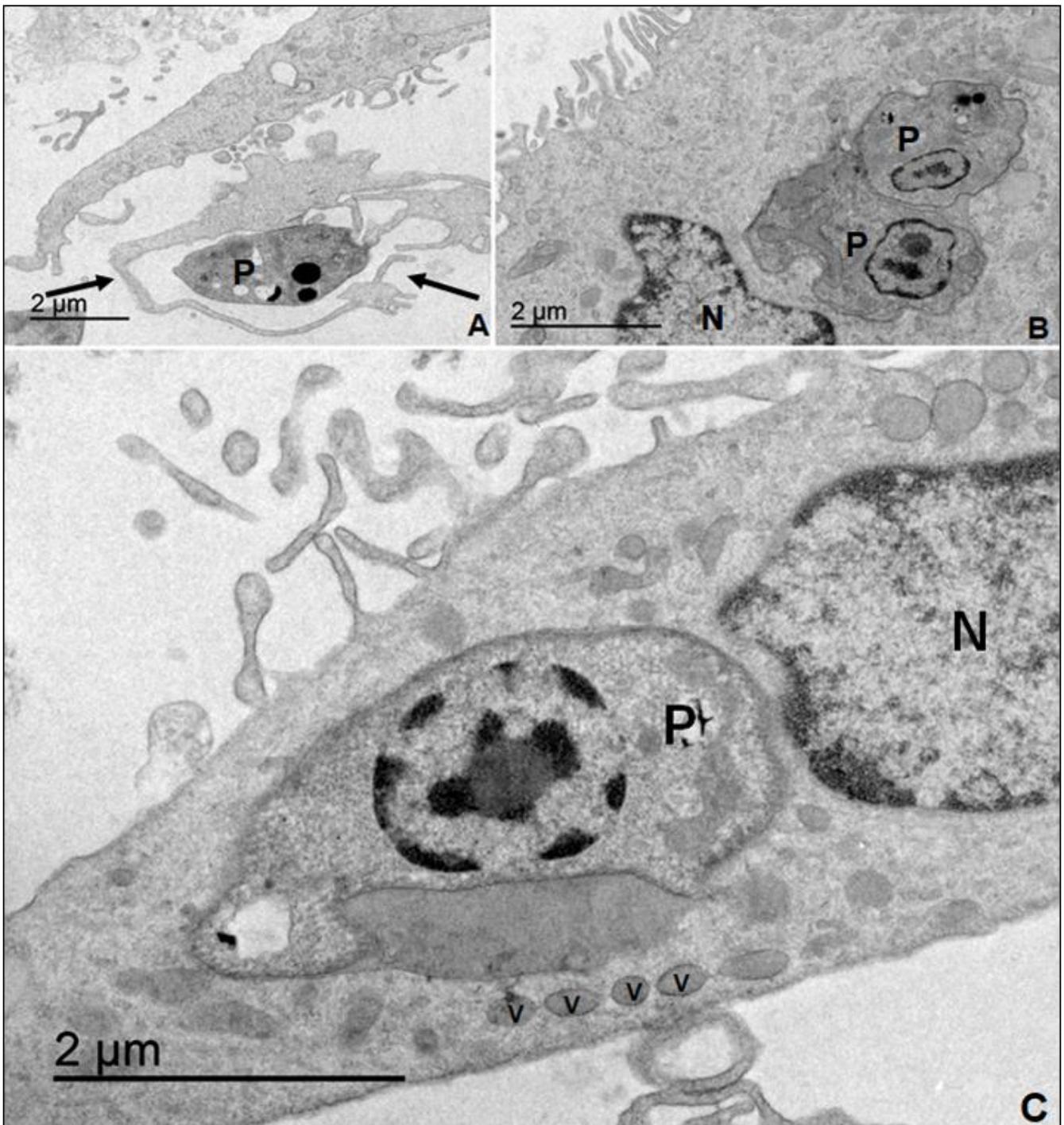


Figura 22 (A-C): Micrografias eletrônicas de transmissão de fibrócitos humanos após 2 horas de interação.

A: Fibrócitos imitando prolongamento citoplasmáticos envolvendo o parasito (P) (→).

B: Parasitos (P) no interior de vacúolos parasitóforos estreitos **C:** Vesículas (V)

próxima ao parasito (P).

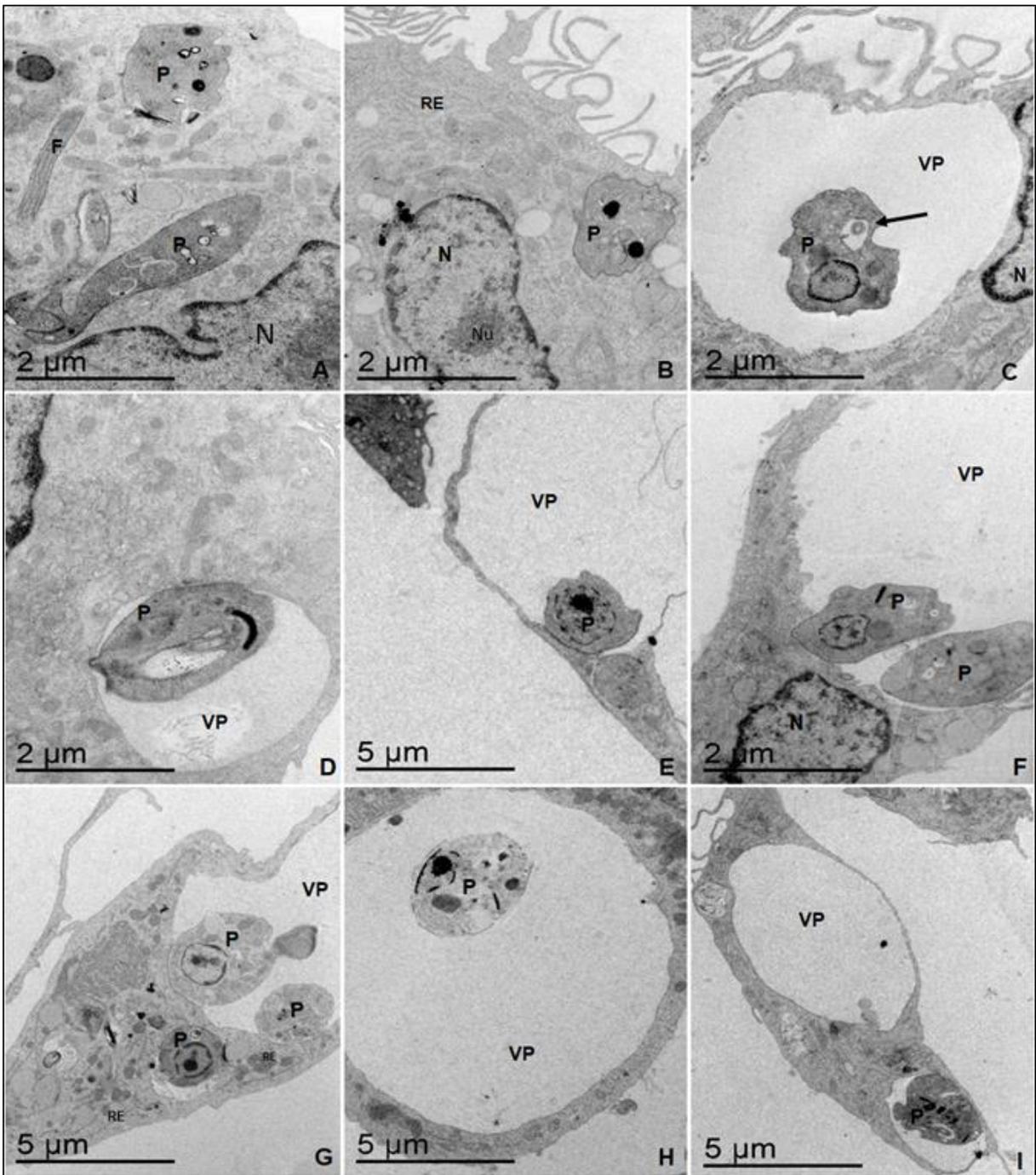


Figura 23 (A-I): Micrografias eletrônicas de transmissão de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*.

A: Fibrócitos no tempo de 6 horas contendo parasitos (P) interiorizados com flagelo aparente (F). **B:** Em 24 horas amastigotas (P) são encontrados dentro de vacúolos parasitóforos, fibrócitos apresentavam retículo endoplasmático rugoso (RE). **C:** Após 48 horas, amastigotas são observados com flagelo interiorizado na bolsa flagelar (→), no interior de grandes vacúolos parasitóforos (VP). **D:** A partir de 72 horas amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos dilatados (VP), o mesmo foi visto nos tempos, **E:** 96 horas. **F:** 120 horas. **G:** 144 horas. **H:** 10 dias. **I:** 15 dias de interação.

4.4 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios durante a interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*

Com o objetivo de avaliar a modulação de citocinas pela infecção com *L. amazonensis*, os sobrenadantes foram coletados e as citocinas avaliadas nos diferentes intervalos estudados. Em conjunto, avaliamos a liberação da desidrogenase láctica (LDH) para entender se a diminuição do número de células na cultura se associava com a infecção ou com a morte celular por necrose.

A análise estatística não demonstrou haver modulação significativa de nenhum dos mediadores avaliados após a infecção (não mostrado). No entanto, a análise de *Heatmaps* evidenciou que citocinas como IL-12 e TGF- β parecem ser positivamente moduladas nas primeiras horas pós-infecção e, nos estágios mais tardios, após 144 horas, IL-10, IL-6, IL-1 β e IFN- γ foram positivamente moduladas (Figura 24). As quimiocinas IP-10 (CXCL-10) e MCP-1 (CCL2) foram positivamente moduladas por *L. amazonensis* em 72 horas (MCP-1/CCL2) e 120 horas (IP-10/CXCL-10) (Figura 25), acompanhados por um aumento de NO (96h) (Figura 26). Os índices de LDH oscilaram ao longo da cultura não apresentando um resultado significativo entre controles e infectados (Figura 27).

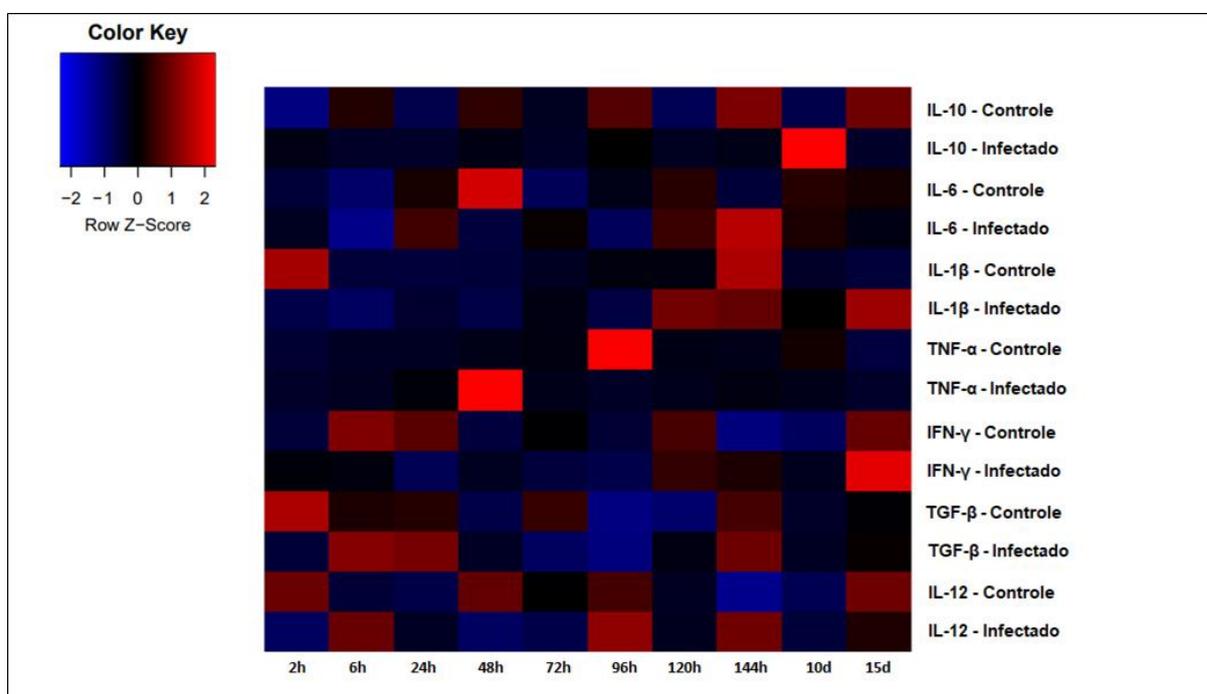


Figura 24: Análise por *Heatmaps* da produção de citocinas presentes na interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*.

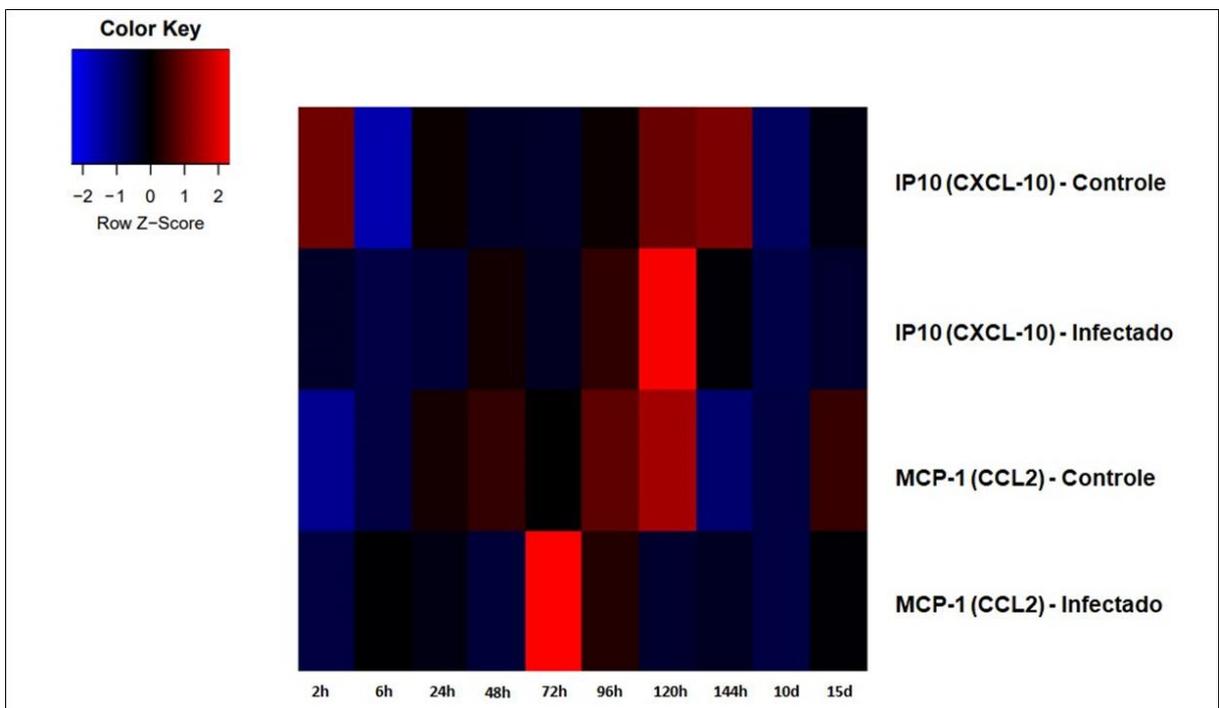


Figura 25: Análise por *Heatmaps* da produção de quimiocinas presentes na interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*.

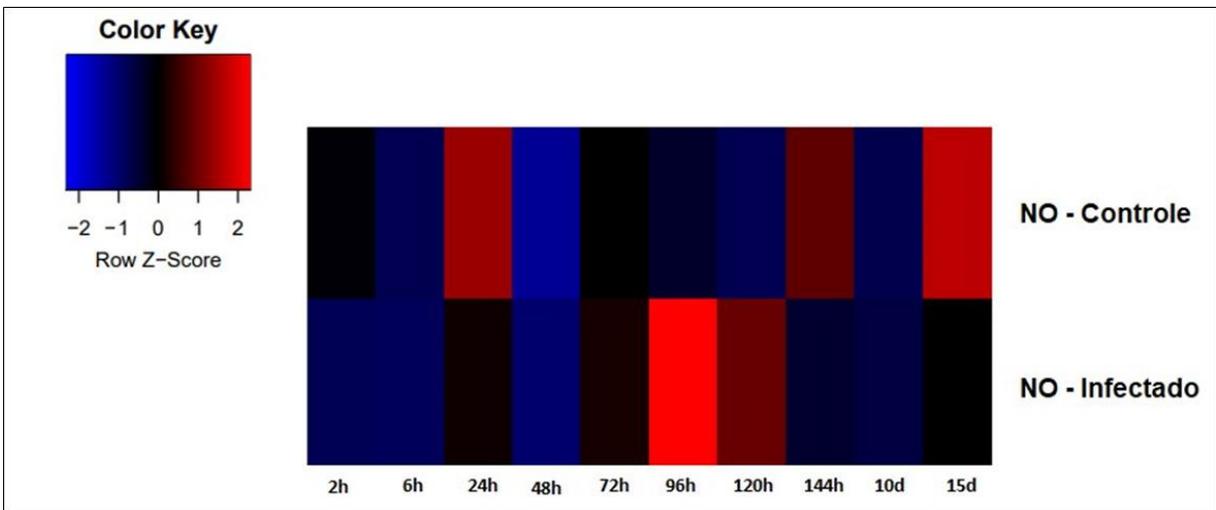


Figura 26: Análise por *Heatmaps* da produção de NO presente na interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*.

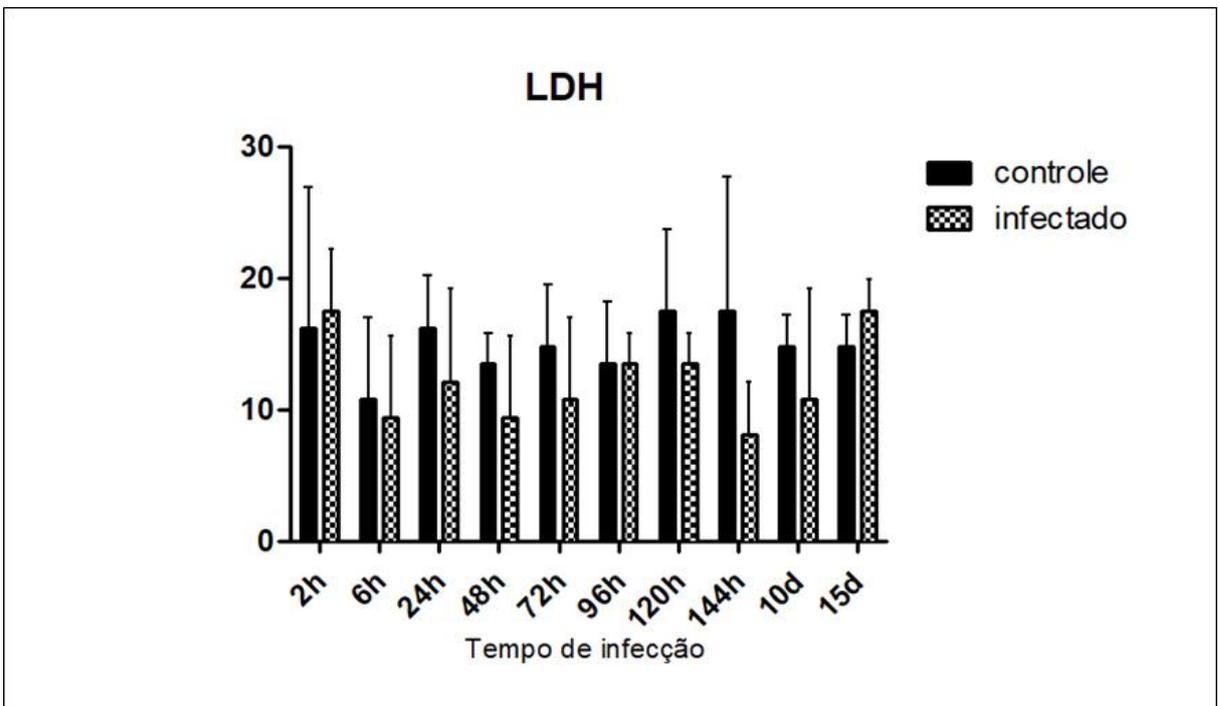


Figura 27: Gráfico representativo da produção de LDH presente na interação de fibrócitos humanos com *L. amazonensis*.

5. DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta por Bucala e colaboradores (1994), há 25 anos, os fibrócitos vêm sendo utilizados em diversos trabalhos que correlacionam o conhecimento da fisiologia e papel patológico frente a algumas doenças. Nos primeiros momentos das infecções os fibrócitos são recrutados para o local da lesão, exibindo características inflamatórias e participando da remodelação dos tecidos (revisto por Reilkoff et al., 2011; Bucala, 2015). Contudo, para sua utilização se faz necessário a identificação precisa, sendo de extrema necessidade caracterizá-lo morfológicamente e fenotipicamente (Quan et al., 2004), pois se trata de uma célula que não está no seu estágio final de diferenciação, possuindo características similares a monócitos, fibroblastos e macrófagos (Chesney et al., 1997; Wang et al. 2007, Pilling et al. 2009).

Na primeira etapa deste estudo foi realizada a identificação e a caracterização dos fibrócitos de sangue periférico humano, no qual demonstramos que os fibrócitos mantidos em culturas durante 15 dias apresentavam morfologia característica, com sua superfície alongada, eventualmente arredondada na região nuclear e com diversas projeções citoplasmáticas do tipo filopódios, dados esses compatíveis com a descrição feita por outros autores (Bucala, et al., 1994; Balmelli, et al., 2005; Macedo-Silva et al., 2014).

A partir da análise ultraestrutural confirmamos uma série de características morfológicas que são divergentes de outros tipos celulares, como os monócitos, fibroblastos e macrófagos. Goasguen e colaboradores (2009) descreveram que os monócitos possuem o núcleo com morfologia reniforme, ou seja, em forma de rim e lobulada/recuada. Em nossas análises, confirmamos essa diferença em relação aos fibrócitos que apresentavam núcleo arredondado característico com heterocromatina periférica. Evidenciamos ainda que o citoplasma dos fibrócitos são ricos em organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso que se distribui ao longo do citoplasma ou em rede de cisternas achatadas, características esta que não é compartilhada com fibroblastos, pois estas células possuem retículo endoplasmático com perfil bem dilatados, qualidade relacionada à célula que apresenta altas taxas de produção de proteínas de matriz (Côrte-Real et al., 1995). A análise da membrana plasmática dos fibrócitos mostrou diversos prolongamentos citoplasmáticos bem finos e longos, os filopódios que se distribuem por toda a superfície celular. Esta característica morfológica poderia ser utilizada para

diferenciar os fibrócitos dos macrófagos que, segundo as descrições de Hsiao e colaboradores (2011) e Menzyanova e colaboradores (2018), possuem prolongamentos citoplasmáticos do tipo lamelipódios, projeções citoplasmáticas que são compostas por estrutura membranosa, uma bainha lamelar em relevo na periferia das células.

Em ensaios fenotípicos utilizados em muitos estudos, os fibrócitos são distinguidos pela expressão simultânea de CD34 ou CD45 e colágeno tipo I (Chesney et al., 1997; Pilling et al., 2003; Moeller et al., 2009; Grieb & Bucala, 2012; Wang et al., 2015; revisto por Lin et al., 2016). Contudo, no trabalho de Macedo-Silva e colaboradores (2014), os autores utilizaram a associação do CD45 e HSP-47, uma nova dupla marcação para a identificação de fibrócitos de sangue periférico de camundongos BALB/c. A utilização do HSP-47 associa o fibrócito à produção de colágeno tipo I, diferenciando-o de macrófagos e de outros tipos celulares de origem monocítica, identificados somente pela expressão da molécula CD45. A utilização tanto de CD45/Colágeno tipo I e CD45/HSP47 se mostraram eficazes para identificar os fibrócitos humanos, pois, foi possível observar claramente a marcação de CD45 em toda superfície celular e de HSP47 ou colágeno tipo I distribuída por todo o citoplasma, possivelmente associado ao retículo endoplasmático do fibrócito. Desta forma, a dupla marcação do CD45/HSP47 utilizada anteriormente na caracterização dos fibrócitos de camundongos da linhagem BALB/c foi eficiente na identificação dos fibrócitos do sangue periférico humano, nos permitindo sugerir a outros trabalhos a utilização desta nova dupla marcação para a identificação de fibrócitos dos diversos grupos de mamíferos.

Alguns estudos demonstraram que determinadas espécies de *Leishmania* no início da infecção são capazes de aderir pelo flagelo ou pela parte posterior do corpo. Sugerindo que, o ponto de adesão seja determinado por alguns fatores, dentre eles, a distribuição diferencial das moléculas de superfície como gp63 e LPG entre as espécies do parasito (Bogdan et al., 2000; revisto por Podinovskaia & Descoteaux, 2015). Com base nesta adesão, o processo fagocítico se inicia através do enrolamento do corpo ou flagelo do parasito pelo prolongamento da célula hospedeira. Este relato foi descrito nos estudos relacionados com a infecção de macrófagos peritoneais e fibroblastos por várias espécies de *Leishmania* (Côrte-Real et al., 1988; Ritting, et al., 1998; Bogdan, et al., 2000; Noben-Trauth et al., 2003; Hespanhol, et al., 2005; Hsiao et al. 2011). Esta adesão também foi observada em fibrócitos de camundongos da linhagem BALB/c nos estudos de Macedo-Silva e

colaboradores (2014). Foi observado que fibrócitos em contato com as promastigotas de *L. amazonensis*, foram capazes de fagocitar rapidamente os parasitos. Esses dados corroboram com as nossas análises onde observamos que durante a interação de fibrócitos humanos com promastigotas de *L. amazonensis* estas aderem tanto pelo corpo quanto pelo flagelo do parasito parecendo ser de forma não-direcionada. Além disso, observamos que os fibrócitos foram capazes de emitir longos prolongamentos citoplasmáticos os quais enrolaram os parasitos favorecendo a fagocitose.

Dados mostraram que a adesão da *Leishmania* em macrófagos é mediada por interações entre receptores especializados na superfície dos fagócitos e ligantes localizados na superfície do parasito (de Souza, 2005). Ritting e colaboradores (1998) propuseram que a interação do parasito com a célula hospedeira através do envolvimento por pseudópodes seja reflexo da cooperação entre os receptores de adesão e de fagocitose da célula hospedeira. A partir desses relatos e dos resultados obtidos no presente estudo sugerimos que os fibrócitos humanos possuem receptores de superfície que reconhecem as leishmanias como por exemplo, os receptores “Toll-like”. A presença destes em fibrócitos foi relatada por Balmelli e colaboradores (2005) que sugeriram o seu envolvimento no reconhecimento e interiorização de patógenos por fibrócitos. Este evento foi mostrado em estudos com macrófagos e células NK a participação efetiva do receptor TLR-2 no reconhecimento da LPG de *Leishmania spp.* (de Veer et al., 2003; Chauhan et al., 2017), mostrando assim um alvo inicial para estudos de identificação dos receptores de superfície que estão presentes durante a interação dos fibrócitos do sangue periférico humano com parasitos do gênero *Leishmania*.

Estudos têm expandido o conhecimento da resposta de diferentes tipos celulares frente a infecções com parasitos do gênero *Leishmania*. Existe um relato que se tornou clássico nesta infecção: a suscetibilidade dos macrófagos a este parasito com a formação de vacúolos parasitóforos dilatados contendo as amastigotas no hospedeiro mamífero. As amastigotas que resistem ao ambiente ácido e à ação das hidrolases, se multiplicam no interior dos macrófagos até romper a membrana plasmática e serem liberadas no meio extracelular (Späth et al., 2003; revisto por Opperdoes & Coombs, 2007; revisto por Liu & Uzonna, 2012). Estudos com fibroblastos mostraram resultados similares aos descritos em macrófagos, nos quais estas células, *in vitro*, foram suscetíveis à infecção por várias espécies de *Leishmania*, além disso foi descrito que durante a infecção os parasitos foram

capazes de se diferenciar de promastigotas em amastigotas em vacúolos parasitóforos, além de se multiplicarem no interior dos fibroblastos (Chang, 1978; Schwartzman e Pearson, 1985; Côrte-Real et al, 1995; Bogdam et al., 2000; Minero et al., 2004).

Evidenciamos similaridades entre os resultados descritos na infecção de macrófagos e fibroblastos, com a infecção dos fibrócitos humanos que permaneceram infectados durante pelo menos os 15 dias de interação e que *L. amazonensis* sobrevive em vacúolos parasitóforos onde se diferencia em amastigotas. Após 24 horas de infecção se formam grandes vacúolos parasitóforos, que contêm mais de uma amastigota por vacúolo, dado este indicativo de que os parasitos foram capazes de subverter os mecanismos de defesa do fibrócito iniciando um processo de resistência e multiplicação. Além disso, foi observado o rompimento da membrana plasmática e liberação de amastigotas no meio, onde estes parasitos foram capazes de aderir novamente aos fibrócitos em cultivo, evidenciando a suscetibilidade dos fibrócitos humanos a re-infecções por amastigotas.

Alguns estudos mostraram que fibroblastos de derme e os fibroblastos reticulares de linfonodo podem atuar como células hospedeiras para *Leishmania*, sendo capazes de fagocitar e albergar tanto promastigotas quanto amastigotas por longos períodos, evidenciando o papel destas células no mecanismo de escape do parasito frente ao sistema imune hospedeiro (Bogdan et al, 2000). Estas observações corroboram os nossos resultados, onde os parasitos, promastigotas e amastigotas foram capazes de aderir e serem internalizados pelos fibrócitos, mas incapazes de controlar a infecção. No trabalho de Miles e colaboradores (2005), foi demonstrado que amastigotas de *Leishmania* revestidas com IgG do hospedeiro ligam-se aos receptores Fc (FcγR) nos macrófagos para facilitar a entrada nessas células. Esta adesão e entrada subsequente ativam vias de sinalização que impedem a morte dos macrófagos e o favorecimento do crescimento do parasito intracelular.

A partir destes eventos levantamos a seguinte hipótese: *L. amazonensis* modula o reconhecimento através da ligação com receptores que desativam o fibrócito e inibem a capacidade que a célula teria de gerar uma resposta inflamatória, ou ativam uma resposta anti-inflamatória fazendo com que os fibrócitos sejam capazes de endocitar novamente os parasitos sem tampouco reconhecê-los como um agente invasor.

As análises da infecção ao longo da cinética nos levaram a observar que a quantidade de fibrócitos aderidos ao substrato no último dia (15 dias) de infecção diminuiu de forma expressiva. Este fato nos levou a analisar se a diminuição do número de células no momento final da cinética de infecção se relacionava com morte celular por necrose. Uma vez que se trata de um cultivo longo e sem soro (soro free), assim optamos por medir os índices de LDH para distinguir se essa diminuição se associava com a infecção ou não. Os dados mostraram que os índices de LDH não foram diferentes em comparação as culturas controles. Estes resultados em conjunto com as análises morfológicas da interação que não mostraram sinais de morte celular por outro fenômeno como por exemplo, autofagia ou apoptose. Assim podemos inferir que a diminuição do número de fibrócitos tem estreita relação com a infecção pelo parasito e que, o seu estabelecimento e a multiplicação da *L. amazonensis* seria o fenômeno responsável por romper todos os fibrócitos ao longo da cinética, no modelo de cultivo utilizado neste estudo. Explicando assim, a diminuição significativa após 15 dias de interação do percentual de fibrócitos infectados. Estes dados se contrapõem aos descritos por Macedo-Silva e colaboradores (2014) que estudaram a infecção dos fibrócitos de camundongos da linhagem BALB/c infectados com *L. amazonensis* e observaram que após 24 horas de infecção ocorreu uma redução do número de amastigotas interiorizadas e após 72 horas os fibrócitos foram capazes de debelar a infecção, permanecendo as células em cultivo livres dos parasitos. Por outro lado, não sendo relatada a diminuição do número de células no cultivo ao longo dos 7 dias de cinética. Os dados anteriores mostram que os fibrócitos podem atuar com diferentes respostas a depender do *background* genético do hospedeiro, da sua condição imunológica, bem como das espécies do parasito do gênero *Leishmania*.

Durante a análise da infecção observamos que não houve alterações no perfil fenotípico dos fibrócitos. Assim realizamos estas análises, pois é recorrente o conhecimento que os fibrócitos não estão no estágio final de diferenciação celular, dependendo do estímulo, estas células podem se diferenciar em fibroblastos e/ou miofibroblastos, ou mesmo em adipócitos (Abe et al., 2001; Wang et al., 2007; Sazuka et al., 2013).

A análise ultraestrutural da infecção mostrou que nos primeiros momentos da interação com promastigotas de *L. amazonensis* com os fibrócitos, estes foram capazes de interagir com parasitos, emitindo filopódios. Assim evidenciamos a conversão de promastigotas para amastigotas. Além disso, observamos algumas

vesículas lisossomais no citoplasma destas células, podendo destacar um material eletrondenso em seu interior, similar ao encontrado no interior dos vacúolos parasitóforos contendo parasito. Este relato pode sugerir que os fibrócitos foram capazes de responder à infecção com *L. amazonensis*, porém não foram eficazes para a eliminação parasitária, pois nos demais tempos observamos parasitos íntegros e se multiplicando, mostrando assim que *L. amazonensis* foi capaz de modular a resposta do fibrócito ao seu favor. Estes dados são diferentes aos achados de Macedo-Silva e colaboradores (2014) no modelo murino, onde verificaram a presença de diversas vesículas lisossomais e de grandes endossomas no citoplasma dos fibrócitos com material eletrondenso. Além disso, observaram este mesmo conteúdo no interior de vacúolos parasitóforos contendo promastigotas em poucas horas de infecção. Estes dados indicaram uma possível produção enzimática nos fibrócitos e, a provável fusão fagolisossomal nos vacúolos parasitóforos. Desta forma, os autores sugeriram que a alta produção de NO juntamente com a provável ação enzimática oriunda dos lisossomos e presente no interior dos vacúolos parasitóforos tenham sido determinantes para a destruição dos parasitos nos primeiros momentos da infecção por *L. amazonensis*. Em conjunto, os dados aqui apresentados demonstram que os fibrócitos podem ter diferentes papéis, na infecção murina no modelo de BALB/c e na infecção humana, no entanto, novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de identificar os mecanismos de controle da carga parasitária na infecção das células humanas.

A partir da entrada da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, diversas células desencadeiam respostas inflamatórias como o estímulo de citocinas, quimiocinas e fatores que medeiam a resposta frente ao parasito que podem colaborar para a susceptibilidade ou resistência à infecção.

Para avaliar a participação dos fibrócitos na resposta inflamatória provocada por *L. amazonensis*, foi analisada a produção de mediadores inflamatórios pelos fibrócitos humanos nos diferentes tempos de infecção. Neste contexto, observamos que os fibrócitos foram capazes de produzir citocinas e fatores pró e anti-inflamatórios, o que pode indicar a sua participação na modulação da resposta imune durante a infecção por *L. amazonensis* em humanos. Estes dados são corroborados por Ji e colaboradores (2003) que demonstraram em camundongos que a resposta do hospedeiro à infecção por *L. amazonensis* pode exibir um fenótipo intermediário, ocorrendo um balanço entre a resposta Th1/Th2, levando à suscetibilidade.

Alguns estudos demonstraram que as citocinas IFN- γ e TNF- α possuem papéis essenciais no controle de patógenos intracelulares através do aumento atividade macrofágica e síntese de NO para a eliminação parasitária (Liew et al., 1997; Schoenborn & Wilson, 2007). Os nossos resultados não corroboraram com os dados descritos anteriormente e sugerimos que, nas condições testadas, *L. amazonensis* foi capaz de impedir a ativação e diferenciação de fibrócitos humanos, favorecendo sua sobrevivência e persistência nas células hospedeiras. Contudo, no estudo de Wanasen e colaboradores (2007) foi demonstrado que o crescimento de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos murinos foi aumentado na presença de IFN- γ . Assim podemos explicar o aumento da atividade expressiva de IFN- γ no 15^o de infecção, ainda que não significativa, quando observamos uma multiplicação expressiva de amastigotas no interior dos fibrócitos humanos em comparação aos tempos anteriores.

Macedo-Silva e colaboradores (2014) utilizaram fibrócitos de camundongo BALB/c infectados com *L. amazonensis* e evidenciaram um aumento da produção de NO nas primeiras duas horas de infecção. Este fenômeno foi associado com a capacidade de limitar a multiplicação dos parasitos nos vacúolos parasitóforos dos fibrócitos. Outros trabalhos, também evidenciaram o papel do NO no controle da infecção por *Leishmania* (Murray e Delph-Etienne, 2000; Mukbel et al. 2007; Horta et al., 2012), contudo, esse protozoário possui mecanismos que interferem na produção de NO pela célula hospedeira (Cunningham, 2002; Wanasen et al., 2007). Nossos resultados mostram o aumento da produção de NO em 96 horas de infecção, sugerindo uma tentativa de controle da infecção pelos fibrócitos. No entanto, observa-se a diminuição da produção de NO pareado com o aumento do número de parasitos no interior das células que pode ter colaborado para o estabelecimento da infecção a partir de 144 horas. Esses dados têm relação com estudos que descrevem os mecanismos de escape dos parasitos, que são capazes de interferir na produção de NO das células hospedeiras. Acreditamos que esta ação do parasito foi favorecida pela ausência da produção de IFN- γ pelos fibrócitos humanos, e isto impactou negativamente a síntese de NO nestas células.

O TGF- β possui um papel importante no controle de respostas imunes contra patógenos, na manutenção da homeostase e na promoção da tolerância imunológica (Wan & Flavell, 2007; Tran, 2012; Maspi et al., 2016). Foi demonstrado que essa citocina aumenta a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* pela supressão do NO (Kedzierski & Evans, 2014). Observamos durante a infecção de

fibrócitos, um aumento de fibrócitos infectados a partir de 6 horas associada a um aumento da produção de TGF- β . Este evento pode se justificar pelo fato de o TGF- β ter uma atividade anti-inflamatória com múltiplas ações sobre as células da resposta imune, podendo inibir ativação de células como os macrófagos e a produção de IFN- γ como observado por Yoshimura e colaboradores (2010).

Estudos mostram que IL-12 apresenta um papel importante no desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1, sendo necessária para a resistência frente à infecção por *Leishmania* (Scharton-Kersten et al., 1995; revisto por Okwor & Uzonna, 2016). Estudos *in vivo* com camundongos mostram que a infecção com *L. amazonensis* promove a diminuição dos níveis de alguns mediadores inflamatórios principalmente entre as 4 primeiras semanas (Ji et al, 2003). Na infecção *in vitro* dos fibrócitos humanos com *L. amazonensis*, observamos que a produção de IL-12 apresentou pequenas variações ao longo da cinética e correspondeu, pelo menos no tempo de 96h com o aumento da produção de NO que dá indícios sobre a tentativa de resistência dos fibrócitos, porém não satisfatória pois a infecção se manteve progressiva, tendo sido observado um aumento de amastigotas internalizadas em fibrócitos com 15 dias de infecção.

Dados da literatura mostram que a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* está relacionada principalmente com a produção de IL-10, pois apresenta um importante papel imunorregulador na fase inicial da infecção, sendo capaz de modular a ação de citocinas pró-inflamatórias facilitando assim a proliferação do parasito (Belkaid et al., 2001; Jones et al., 2002; Maspi et al., 2016). Assim, observamos que os fibrócitos produzem IL-10, IL-6 e IL-1 β constitutivamente o que indica o favorecimento da multiplicação dos parasitos e sua permanência nas células. A produção de IL-6 em alguns modelos estimula a suscetibilidade à doença na leishmaniose cutânea (Maspi et al., 2016). Além disso, a atividade de IL-1 β promove a patologia e a formação de lesões exacerbadas em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* (Gonzalez-Lombana et al., 2013; Maspi et al., 2016). Estes resultados estão de acordo com o que observamos na infecção dos fibrócitos onde evidenciamos a multiplicação e a permanência dos parasitos no interior dos vacúolos parasitóforos.

Estudos têm mostrado que as quimiocinas desempenham papéis importantes durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, incluindo funções de defesa do hospedeiro, tais como recrutamento de leucócitos e ativação celular, participação na imunidade e atividade leishmanicida, podendo indicar que essas quimiocinas

podem ser eficazes para o controle e/ou progressão da infecção (Teixeira et al., 2006; Oghumu, 2010). Foi demonstrado pelo estudo de Vasquez & Soong (2006) que camundongos BALB/c tratados com a quimiocina CXCL10 e infectados com *L. amazonensis* diminuíram a carga parasitária. Além disso, foi mostrado que esta quimiocina também pode atuar na resposta protetora contra *L. donovani*, induzindo uma resposta Th1 (Gupta, 2009). Os nossos resultados indicam que em 120 horas de infecção ocorreu uma atividade expressiva da quimiocina CXCL10 a qual não foi capaz de auxiliar na redução da carga parasitária ou na diminuição do percentual de fibrócitos humanos infectados. Em modelo murino de infecção por *L. major*, CCL2 (MCP-1) tem se mostrado indispensável para o controle da infecção, sendo capaz de gerar uma resposta imune protetora *anti-Leishmania* (Quinones et al. 2007). Evidenciamos que em 72 horas de infecção, há uma pequena diminuição do percentual de fibrócitos infectados, contudo não há impacto na carga parasitária total dos fibrócitos infectados. Tal achado sugere que CCL2 (MCP-1) não tem efetiva ação para a diminuição da carga parasitária em fibrócitos humanos infectados com *L. amazonensis*.

Com base nestes dados, sugerimos que nos primeiros momentos da infecção os fibrócitos humanos possam ser recrutados para o local da inoculação do parasito, podendo atuar como células hospedeiras na resposta inicial contra o parasito, pois são capazes de reconhecer e endocitar tanto promastigotas quanto amastigotas. Contudo, *L. amazonensis* consegue modular a resposta dos fibrócitos humanos, fazendo com que este apresente um papel importante no mecanismo de escape do parasito. Os parasitos se multiplicam no interior dos fibrócitos, ocorrendo a lise celular e podendo ser liberados para infectar outros tipos celulares ou o próprio fibrócito.

A presente dissertação abre perspectivas para estudos mais aprofundados em relação à interação de parasitos do gênero *Leishmania* com fibrócitos. Como por exemplo, os receptores de superfície que estão presentes durante a interação e por quais mecanismos a *Leishmania* conseguem permanecer nos fibrócitos humanos.

6. CONCLUSÃO

- A associação dos anticorpos contra as proteínas HSP47 e CD45 para caracterização dos fibrócitos do sangue periférico se revelou uma excelente estratégia para a identificação dos fibrócitos humanos.
- Os fibrócitos humanos apresentam a capacidade de reconhecer e fagocitar promastigotas de *L. amazonensis* que se convertem em amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos.
- As amastigotas da *L. amazonensis* se multiplicam no interior de vacúolos parasitóforos dilatados, rompem as células e são liberadas no meio de cultivo e re-infectam outros fibrócitos.
- A diminuição do número de fibrócitos tem estreita relação com a interação pelo parasito. O estabelecimento e a multiplicação da *L. amazonensis* seria o fenômeno responsável por romper todos os fibrócitos ao longo da cinética no modelo de cultivo utilizado neste estudo, pois os índices de LDH não foram diferentes em comparação as culturas controles.
- Os fibrócitos humanos são suscetíveis à *L. amazonensis* e respondem com a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, durante os 15 dias de interação.
- A baixa produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α colaborou para a diminuição dos índices de NO, proliferação do parasito e o estabelecimento da interação nos fibrócitos humanos.
- Os fibrócitos humanos produzem IL-10, IL-6 e IL-1 β constitutivamente que indica um posicionamento para uma resposta anti-inflamatória deste grupo celular.
- A *L. amazonensis* modulou a produção das quimiocinas CXCL10 (IP-10) e CCL2 (MCP-1) nos fibrócitos humanos, que não tiveram uma ação efetiva para a diminuição da carga parasitária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, R., et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *The Journal of Immunology*. 2001; 166: 7556-7562.
2. Abreu-Silva, A.L., et al. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Veterinary Parasitology* 2004 Maio 26; 121(3-4):179-87.
3. Afonso, L.C., Scott, P. Immune response associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. 1993; 61: 2952-59
4. Akhoundi M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004349.
5. Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*. 2004; 75(6):639-53.
6. Alexander, J., Russell, D.J. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advanced in Parasitology*. 1992; 31: 175-254.
7. Amato, V.S., et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Tropica*. 2008; 105(1):1-9.
8. Azeredo-Coutinho, R.B., et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101(7):735-7.
9. Azeredo-Coutinho, R.B., Mendonça, S.C.F. Formas clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas. In: Conceição-Silva, F., Alves, C.R. *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. 311-326p.

10. Bacon, K.M., et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine*. 2013; 31(3):480-6.
11. Balmelli, C., et al. Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005; 77: 923-933.
12. Barbosa, L.A., et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils. *Front Immunol*. 2018; 9:1818.
13. Barral, A., et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, v.44, n.5, p.536-46, 1991.
14. Belkaid, Y., et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001; 194:1497-1506.
15. Bellini, A., Mattoli, S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*. 2007; 87(9):858-70.
16. Berman, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 24(4):684-703.
17. Bianchetti, L., et al. Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes. *J Cell Mol Med*. 2012; 16(3):483-95.
18. Blom, K., et al. The genetically determined production of the alarmin eosinophil-derived neurotoxin is reduced in visceral leishmaniasis. *APMIS*. 2018; 126(1):85-91.
19. Bogdan C., et al. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 191 (12):2121-29.

20. Boxman, I.L., et al. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Archives of Dermatological Research*. 1996; 288(7):391-8.
21. Brandonisio, O., et al. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infection*. 2004; 6(15):1402-9.
22. Brewig, N., et al. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cells subtypes. *The Journal of Immunology*. 2009; 182 (2): 774-783.
23. Brüne, B., et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(6):595-637.
24. Bucala, R., et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular medicine*. 1994; 1: 71-81.
25. Bucala, R. Fibrocytes at 20 Years. *Mol Med*. 2015;21 Suppl 1:S3-5.
26. Burza, S. et al. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 ;392(10151):951-970.
27. Camargo, L.M.A., Barcinski, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e calazar. *Ciência e Cultura*. 2003; 1: 34-37.
28. Carneiro, P.P., et al. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148084.
29. Chang, K.P. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts in vitro: absence phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1978; 27:1084-96.
30. Chauhan, P., et al. Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. *Clin Exp Immunol*. 2017;190(2):167-186.

31. Chesney, J., et al. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 6307-6312.
32. Chesney, J., et al. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *The Journal of Immunology*. 1998; 160: 419-425.
33. Conceição-Silva, F. Leishmanioses do continente americano. /organizado por Fatima Conceição-Silva e Carlos Roberto Alves. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. 512 p.
34. Conceição-Silva, F. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. In: Conceição-Silva, F. e Alves, C. R. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. 357-379p.
35. Côrte-Real S., et al. *Leishmania mexicana amazonensis*: heterogeneity in 5'-nucleotidase and peroxidase activities of mononuclear phagocytes during in vivo and in vitro infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988; 83:113-121
36. Côrte-Real S., et al. Differential expression of the plasma membrane Mg²⁺-ATPase and Ca²⁺ ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts in vitro. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1995; 27: 359-366.
37. Cowper, S.E., Bucala, R. Nephrogenic fibrosing dermopathy: suspect identified, motive unclear. *Am J Dermatopathol*. 2003; 25(4):358.
38. Cruz, A.F., et al. Mucosal leishmaniasis in Brazilian patients: two case reports with similar clinical presentation and different approaches. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122(6):e199-e203.
39. Cunningham, A.C. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Biology*. 2002; 72, 132-141.

40. de Souza W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(1):1–18.
41. de Veer, M.J., et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 2003; 33(10):2822-31.
42. Diefenbach, A., et al. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science.* 1999; 284(5416):951-5.
43. Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Review of Immunology.* 2004; 4: 211-22.
44. Georgiadou, S.P. e al. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J Transl Int Med.* 2015; 3(2):43-50.
45. Global Health Observatory. GHO. Leishmaniasis - Situation and trends; 2018. Disponível em: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
46. Goasguen, J.E., et al. Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica.* 2009; 94(7):994-7.
47. Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.1. 2003. p.71-80.
48. Gonzalez-Lombana, C., et al. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003243.
49. Grab, D.J., et al. A role for the peripheral blood fibrocyte in leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 2004; 20(1):12.
50. Grieb, G., Bucala, R. Fibrocytes in Fibrotic Diseases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012; 1(1):36-40.

51. Grimaldi, G. Jr., et al. Interactions between *Leishmania mexicana* promastigote and amastigote and murine peritoneal macrophage in vitro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1983; 78: 135-146.
52. Grimaldi Jr., G., Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Review. 1993; 6: 230-250.
53. Guerra, C.S., et al. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. Int J ExpPathol. 2010; 91(5):451-9.
54. Gupta, G., et al. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. J Infect Dis. 2009; v.200, n.8, p.1300-10.
55. Haudek, S.B., et al. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; 48: 18284-18289.
56. Hespanhol, R.M, et al. The expression of mannose-receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2005; 53(1):35-44.
57. Herzog, E.L., Bucala R. Fibrocytes in health and disease. Exp Hematol. 2010; 38(7):548-56.
58. Hong, K.M., et al. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Biol Chem. 2007; 282(31):22910-20.
59. Horta, M.F., et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. J Parasitol Res. 2012; 2012:203818.

60. Hsiao, C.H., et al. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13):1033-44
61. Isgrò, M., et al. Involvement of fibrocytes in allergen-induced T cell responses and rhinovirus infections in asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437(3):446-51.
62. Ji, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66: 338-345.
63. Ji, J. et al. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity* 2003; 71 (8): 4278-88.
64. Jones, D.E., et al. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infection and Immunity.* 2002; 70: 2151-2158.
65. Kane, M.M., Mosser, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology.* 2000; 7: 26-31.
66. Kao, H.K., et al. Peripheral blood fibrocytes: enhancement of wound healing by cell proliferation, re-epithelialization, contraction, and angiogenesis. *Ann Surg.* 2011; 254(6):1066-74.
67. Kaye, P., Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 11;9(8):604-15.
68. Kedzierski, L., Evans, K.J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2014; 30:1-19.
69. Lainson, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Medicina Revista Paraense.* 1997; 11(1): 29-40.

70. Lainson, R., Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendric K, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
71. Leta, S., et al. Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: An Evolving Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(9): e3131.
72. Liew, F.Y., et al Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352(1359):1311–15.
73. Lin, R.J., et al. Role of Circulating Fibrocytes in Cardiac Fibrosis. *Chin Med J (Engl)*. 2016; 129(3):326-31.
74. Lipoldová, M., Demant, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*. 2006;7(4):294-305.
75. Liu, D., Uzonna, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2:83.
76. Lukes, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9375-80.
77. Macedo-Silva, R.M. et al. Peripheral blood fibrocytes: new information to explain the dynamics of *Leishmania* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(1):61-9.
78. Marsden, P.D. Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986; 80:859-876.
79. Martin, P., Leibovich, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*. 2005; 15: 599-607.

80. Martinez, P.A., Petersen, C.A. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. *Immunol Res.* 2014; 59(1-3):153-65.
81. Maspi, N., et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health.* 2016 Sep;110(6):247-260.
82. Mattoli, S. Involvement of fibrocytes in asthma and clinical implications. *Clin Exp Allergy.* 2015t ;45(10):1497-509.
83. Mayadas, T.N., et al. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014; 9:181-218.
84. McAnulty, R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):666-71.
85. McConville, M.J. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends in Parasitology.* 2007; 23: 368-375.
86. Menzhanova, N.G., et al. Screening of biopolymeric materials for cardiovascular surgery toxicity-Evaluation of their surface relief with assessment of morphological. *Toxicol Rep.* 2018; 6:74-90.
87. Miles, S.A., et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Exp. Med.* 2005; 201, 747–754
88. Minero, M.A., et al. [Infection of skin fibroblasts in animals with different levels of sensitivity to *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)]. *Rev Biol Trop.* 2004; 52(1):261-7.
89. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Ed:1 atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 189 p.

90. Moeller, A., et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179(7):588-94.
91. Mukbel, R.M., et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;76(4):669–675.
92. Murray, H.W., Delph-Etienne, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 2000; 68(1):288-93.
93. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews. Immunology*. 2006; 6 (3) 173-182.
94. Niedermeier, M., et al. CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 79(6):1242-51.
95. Nihlberg, K., et al. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: A possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respiratory Research*. 2006; 7: 50-59.
96. Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL2003. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major* . *J Immunol* 170 : 5152-5158.
97. Novais, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *The Journal of Immunology*. 2009; 183 (12): 8.088-8.098.
98. Oghumu, S., et al. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2010; n.3, p389-96.

99. Ohyama, H., et al. Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signaling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation. *Cytokine* 2002; 17(4): 175-81.
100. Okwor, I., Uzonna, J.E. Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2016; 309:32-36.
101. Opperdoes, R., Coombs, G.H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.* 2007; 23 : 149-158.
102. Organização Mundial da Saúde. OMS. Leishmanioses; 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>;
103. Organização Mundial da Saúde. OMS. Leishmanioses – Formas clinicas da Leishmaniose; 2018. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/index2.html.
104. Osório, L.E., et al. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 ;59(1):49-52.
105. Passi, D., et al. Localised leishmaniasis of oral mucosa: report of an unusual clinicopathological entity. *Case Rep Dent.* 2014; 2014:753149.
106. Peng, H., Herzog, E.L. Fibrocytes: Emerging effector cells in chronic inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12(4): 491–496.
107. Peters, N.C., et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 2008; 322 (5908):1634
108. Pilling, D. et al. Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol.* 2003;

109. Pilling, D., et al. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *The Journal of Leukocyte Biology*. 2006. 79(6):1242-51.
110. Pilling, D., et al. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One*. 2009; 4(10): e7475.
111. Pinheiro, R.O., Bergmann, B. R. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. 2007; 102(1): 79-82
112. Phan, S.H. Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008; 5: 334-337.
113. Phillips, R.J., et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004; 114(3):438-46.
114. Podinovskaia, M., Descoteaux, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction.
115. Prina, E., et al. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *Journal of Cell Science*. 2004; 117 (2): 315-25.
116. Purohit, H. M., et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis – A rare cutaneous presentation in an HIV-positive patient. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2012; 33(1): 62–64.
117. Quan, T.E., et al. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004; 36: 598-606
118. Quinones MP, et al. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Parasite Immunol*. 2007 Apr;29(4):211-7.

119. Reilkoff, R.A, et al. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(6):427-35
120. Ribeiro-Gomes, F.L, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2004; 172(7):4454-62.
121. Rittig, M.G., et al. Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infect Immun.* 1998;66(9):4331–9
122. Rogers, M.E., Bates, P.A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens.* 2007; 3 (6): e91.
123. Rojas-Jaimes, J., et al. Case Report: Mucosal Leishmaniasis Presenting with Nasal Septum Perforation after Almost Thirty Years. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 ;99(2):327-330.
124. Rossi, M., Fasel, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int Immunol.* 2018; 30(3):103-111.
125. Sacks, D.L., Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* mice. *Nature Review of Immunology.* 2002; 2: 845-58.
126. Sacks, D., Anderson, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev.* 2004; 201:225-38.
127. Schwartzman, J.D., Pearson, R.D. The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1985; 34 (5): 850-5.
128. Sahebally, S.M., et al. Circulating fibrocytes and Crohn's disease. *Br J Surg.* 2013; 100(12):1549-56.

129. Späth, G.F., et al. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science*. 2003; 301:1241-1243.
130. Stavitsky, A.B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity* 2004; 72: 1-12.
131. Sazuka, S. et al. Fibrocytes are involved in inflammation as well as fibrosis in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2013; 59:760–8. 11
132. Sakai, N., et al. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens*. 2008; 26(4):780-90.
133. Scharon-Kersten, L.C., et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis, *J. Immunol*. 154 (1995) 5320–5330.
134. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41– 101.
135. Scorza, B.M., et al. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 18;18(6). pii: E1296.
136. Scott, P., et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of Experimental Medicine*. 1988; 168(5): 1675-84.
137. Scott, P., Novais, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016 Sep;16(9):581-92.
138. Schmidt, M., et al. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *Journal of Immunology*. 2003; 170: 380-389.

139. Sun, M., et al. Possible Contribution of Fibrocytes to Increased Type I Collagen Synthesis during the Early Stage of Dermal Wound Repair in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2018; 138(1):240-242
140. Tai, W., et al. Fibrocytes Ameliorate Acute Lung Injury by Decreasing Inflammatory Cytokine and Chemokine Levels and Reducing Neutrophil Accumulation in the Lung. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 44(4):1526-1536.
141. Tarantino, C., et al. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Veterinary Parasitology.* 2001; 102: 77-83.
142. Teixeira, M.J., et al. Chemokine in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 2006; n.1, p32-40.
143. Torres-Guerrero, E., et al. Leishmaniasis: a review. *F1000Res.* 2017; 6:750.
144. Tran, D.Q. TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Cell Mol Biol.* 2012; 4(1): 29–37.
145. Udey, M. C., et al. Skin Dendritic Cells in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Immunobiol.* 2001; 204, pp. 590–594
146. van Griensven, J., et al. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania aethiopica*: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.*;10(3):e 0004495.
147. Van Zandbergh, G., et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology.* 2004; 173 (11): 6.525.
148. Vasquez, R. E., Soong, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Infection and immunity.* 2006; n.12, p. 6769-77.

149. von Stebut, E., et al. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin-12 release from murine skinderived dendritic cells: Implications for the initiation of *anti-Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 1547–1552.
150. von Stebut, E., Tenzer, S. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol.* 2017; pii: S1438-4221(17)30470-8.
151. Wan, Y.Y., Flavell, R.A. ‘Yin-Yang’ functions of TGF- β and Tregs in immune regulation. *Immunol Rev.* 2007; 220:199–213.
152. Wang, J.F., et al. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2007; 15 : 113-121.
153. Wang, C.H., et al. Fibrocyte trafficking in patients with chronic obstructive asthma and during an acute asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135(5):1154-62.e1-5.
154. Wanasen, N., et al. L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. *Infect Immun.* 2007; 75(6): 2802–2810.
155. Williams I. R., Kupper T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Science*, 1996; 58 (18):1485-1507.
156. Yang, L., et al. Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair and Regeneration.* 2005; 13: 398-404.
157. Yoshimura, A., et al. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *J Biochem.* 2010; 147(6):781-92.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE FIBRÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO COM PARASITOS DO GÊNERO LEISHMANIA

Pesquisador: Suzana Côrte Real Faria

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68118217.6.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.289.780

Apresentação do Projeto:

Tese de mestrado que propõe o estudo da participação de fibrócitos humanos na infecção por Leishmania, e na a indução da doença e resposta imune. Resultados obtidos com estudo empregando o modelo murino, previamente desenvolvidos pelo do grupo de pesquisa, sugerem a participação de fibrócitos na infecção por parasitos do gênero Leishmania, sendo assim, o grupo pretende investigar a existência dessas interações em fibrócitos humanos .

O grupo utilizará fibrócitos de sangue humano obtidos por bolsa de sangue e destes obterão culturas primárias de fibrócitos que, posteriormente, serão infectadas com promastigotas de Leishmania amazonensis para análise por microscopia de luz, imunofluorescência indireta (CD45, CD34, HLA-DR, CD80, CD86, ICAM e Hsp47), citometria de fluxo e RT-PCR (IL2, IL4, IL10, IL12, TGF-, IFN-γ, TNF-), Western Blotting (CD45, CD34, HLA-DR, CD80, CD86, ICAM e Hsp47), dosagem de nitrito pelo método de Greiss, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Analisar a interação de fibrócitos do sangue periférico humano com parasitos do gênero Leishmania.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.289.780

Objetivo Secundário: - Caracterizar, identificar e quantificar utilizando a marcação das proteínas CD45, CD34, HLA-DR, CD80, CD86, ICAM e Hsp47 nos fibrócitos presentes no sangue humano;- Analisar a interação dos fibrócitos humanos com promastigotas de parasitos do gênero Leishmania nos tempos de 2, 6, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h;- Avaliar a produção de citocinas (IL2, IL4, IL10, IL12, TGF-, IFN-y, TNF-) liberadas durante a interação dos fibrócitos com parasitos do gênero Leishmania.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O autor menciona formas de minimizar riscos relacionados ao procedimento de coleta e doação de sangue. A saber:

" O serviço de hemoterapia implementará programas destinados a minimizar os riscos para a saúde e garantir a segurança dos doadores e dos seus funcionários. Esta portaria estabelece parâmetros para mitigar riscos, dentro os quais, a coleta será realizada pelo profissional de saúde qualificado, capacitado, conhecedor das regras previstas nesta portaria e sob supervisão médica, avaliará os antecedentes e o estado atual do candidato a doador para determinar se a coleta pode ser realizada sem causar prejuízo ao mesmo. Com a finalidade de proteger os doadores, serão adotadas, tanto no momento da seleção de candidatos quanto no momento da doação, as seguintes medidas e critérios estabelecidos neste regulamento: a frequência anual máxima de doações e o intervalo mínimo entre as doações; as idades mínima e máxima para doação; a massa corpórea mínima; a aferição do pulso; a aferição da pressão arterial; os níveis de hematócrito/hemoglobina; a história médica e os antecedentes patológicos do doador; a utilização de medicamentos; as hipóteses de gestação, lactação, abortamento e menstruação; o jejum e a alimentação adequada; o consumo de bebidas alcoólicas; os episódios alérgicos; as ocupações habituais; e o volume a ser coletado. A coleta de sangue será realizada em condições assépticas, sob a supervisão de médico ou enfermeiro, através de uma única punção venosa, em bolsas plásticas com sistema fechado e estéril destinado especificamente para este fim. Deverá ser evitado punção em locais com lesões dermatológicas ou cicatriciais, inclusive as relacionadas com punções anteriores. A área da pele para punção venosa para coleta deverá ser cuidadosamente preparada. A área escolhida para a punção venosa deverá ser submetida a uma cuidadosa higienização que contemplará duas etapas de antisepsia. A veia a puncionar não deverá ser palpada após a preparação da pele. O procedimento da coleta de sangue garantirá a segurança do doador e do processo de doação. Todo o material utilizado no procedimento será descartável, estéril e apirogênico. O tempo de coleta não será superior a 15 minutos, sendo o tempo ideal de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.289.780

até 12 minutos. Serão adotados cuidados com o doador após a doação, a fim de garantir sua integridade. Será ofertada hidratação oral ao doador depois da doação, antes que o mesmo se retire da instituição. É recomendável que o doador permaneça, no mínimo, 15 minutos no serviço de hemoterapia antes de ser liberado. Os doadores serão instruídos para que: façam o veículo parar imediatamente no caso de, após deixarem o serviço de hemoterapia, ocorrer mal estar ao serem transportados por motocicletas ou conduzirem veículos automotores; aguardem, pelo menos, 60 minutos antes de consumir cigarros, cigarrilhas, charutos, cachimbos ou quaisquer outros produtos fumígenos, derivados ou não do tabaco; aguardem aproximadamente 12 horas antes de realizar qualquer esforço físico, especialmente com o membro relacionado à doação; mantenham a compressão no local da punção em caso de sangramento ou hematomas; e comuniquem ao serviço de hemoterapia caso apresentem qualquer sinal ou sintoma de processo infeccioso, como febre ou diarreia, ou que tenham tido o diagnóstico de alguma doença infectocontagiosa até 7 dias após a doação. Todas as medidas adotadas seguirão também as normas pré-estabelecidas na Resolução CSN. Nº 466/12."

Os riscos apontados não são os riscos do estudo proposto.

O pesquisador relata benefícios indiretos como "...os doadores voluntários não terão benefício direto e sim indireto com os resultados deste estudo. Uma vez que os dados obtidos serão compilados em um artigo científico, no qual será mostrado a participação de fibrócitos provenientes de sangue periférico na leishmaniose tegumentar, podendo assim levar a produção de fármacos que beneficiará a população como um todo."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante. A metodologia adequada e bem fundamentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram avaliados os seguintes documentos:

1)Carta_resposta_pendencias – Carta resposta as pendências a avaliação do CEP. Documento em papel timbrado, assinada e carimbado por Suzana Corte-Real Faria e datado de 24/08/2017.

2)Folha_de_Rosto_Paolla_Roberta – Folha de rosto formato PB assinada pela pesquisadora Suzana Cort-Real Faria como pesquisador principal , datada de 23/08/2017; o diretor do IOC José Paulo

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.289.780

Gagliard Leite assinada no campo instituição proponente e patrocinador principal em nome da FIOCRUZ, datada de 24/08/2017.

3)alteracaoPI – documento em papel timbrado assinado pela coordenadora adjunta do CEP Fiocruz/IOC, datado de 10/08/2017, solicitando alteração de pesquisador principal.

4)Justificativa_ausencia_TCLE_Suzana – carta justificando a solicitação de ausência de TCLE e TALE no estudo proposto. Documento no formato PDF, papel timbrado, assinada e carimbado pela pesquisadora principal do estudo, Suzana Corte-Real Faria e datada de 24/08/2017.

5)justificativa_troca_pesquisador – carta da pesquisadora principal, Suzana Corte-Real Faria, ao CEP solicitando a troca de pesquisador principal do estudo. Documento no formato PDF, papel timbrado, assinada pela pesquisadora principal do estudo, Suzana Corte-Real Faria e por Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto, aluna de mestrado envolvida no estudo, datada de 28/06/2017.

6)Notificacaocep – documento de Anselmo Araujo comunicando a solicitação de Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto para troca de pesquisador do estudo sob cadastro do protocolo CAAE 68118217.6.0000.5248 e autorização do CEP. Documento em papel timbrado, sem assinatura e datado de 10/08/2017.

7)PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_9 -

Informa riscos referentes ao processo de doação e coleta de sangue.

8)Projeto_Mestrado_Paolla_Roberta_de_Paula_Pereira_Pinto – Projeto completo apresentado no formato PDF.

9)Termo_anuencia_HUPE – Declaração de ciência da Unidade de Hemoterapia da UERJ – Serviço de Hemoterapia Herbert de Souza do Hospital Universitário Pedro Ernesto assinada pela responsável pela unidade Flávia Miranda Bandeira em 21/06/2017 e pela pesquisadora principal do estudo Suzana Corte-Real Faria em 28/06/2017. Documento em papel timbrado, assinado, carimbado e datado.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.289.780

O documento estima o início do estudo para julho de 2017 e término para dezembro de 2018. Além disso, o documento sujeita a utilização dos hemocomponentes a autorização da ANVISA.

Recomendações:

Rever, no documento de ciência da pesquisa emitido pelo serviço de hemoterapia da HUPE, a recomendação de autorização prévia da ANVISA antes da doação dos hemocomponentes para a pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências ABAIXO apontadas na avaliação anterior foram atendidas:

1)Folha_de_Rosto

A resolução 466/12 define “pesquisador responsável – pessoa responsável pela coordenação da pesquisa e corresponsável pela integridade e bem-estar dos participantes da pesquisa.” Sendo assim, entende-se que a aluna Paolla Roberta de Paula Pereira Pinto não deve assinar como responsável pela pesquisa e sim sua orientadora. PENDÊNCIA ATENDIDA

2)Informações básicas do projeto, formato PB –

a)Deve constar no resumo e metodologia o nome dos bancos de sangue que fornecerão amostras para o estudo proposto e como essas bolsas serão selecionadas para doação, assim como a carta de anuência destes estabelecimentos. PENDÊNCIA ATENDIDA

b)Como benefício devem ser mencionado o proveito, mesmo que indireto e posterior, ao participante da pesquisa. Entende-se como benefícios indiretos os que abrangem o interesse difuso a ser gerado pela pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA

3)Incluir carta de anuência do banco de sangue que cederá as amostras; PENDÊNCIA ATENDIDA.

A pendência relacionado ao risco do estudo ainda não foi atendida satisfatoriamente.

O item referente aos riscos da pesquisa no documento “Informações básicas do projeto, formato PB” foram modificados, entretanto, ainda assim, estes não são os riscos referentes ao estudo proposto. Os riscos apontados referem-se ao processo de coleta e doação de sangue. Os riscos do estudo proposto referem-se ao sigilo do participante. No documento que traz o projeto descrito na íntegra, o pesquisador informa que os doadores não serão identificados pois não constará nome e procedência dos mesmos, garantindo assim a confidencialidade do processo. Esta

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.289.780

informação deve constar no documento documento “Informações básicas do projeto, formato PB” pois é a forma de prevenir possíveis danos ao participante da pesquisa. O pesquisador pode mencionar que o riscos são improváveis pois os doadores não serão identificados nas amostras de sangue recebidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_905381.pdf | 28/08/2017 10:59:41 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Mestrado_Paolla_Roberta_de_Paula_Pereira_Pinto.pdf | 28/08/2017 10:53:18 | Suzana Côrte Real Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Justificativa_ausencia_TCLE_Suzana.pdf | 28/08/2017 10:51:45 | Suzana Côrte Real Faria | Aceito |
| Outros | Termo_anuencia_HUPE.pdf | 28/08/2017 10:50:45 | Suzana Côrte Real Faria | Aceito |
| Outros | Carta_resposta_pendencias.pdf | 28/08/2017 10:49:19 | Suzana Côrte Real Faria | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto_Suzana_Corte_Real_Faria.pdf | 28/08/2017 10:47:44 | Suzana Côrte Real Faria | Aceito |
| Outros | alteracaoPI.pdf | 10/08/2017 14:08:05 | Anselmo Gomes de Araujo | Aceito |
| Outros | notificacaocep.pdf | 10/08/2017 14:08:05 | Anselmo Gomes de Araujo | Aceito |
| Outros | justificativa_troca_pesquisador.pdf | 28/06/2017 19:15:15 | PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | justificativa_ausencia.pdf | 26/04/2017 20:01:25 | PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracao_orientador.jpg | 26/04/2017 18:47:49 | PAOLLA ROBERTA DE PAULA PEREIRA PINTO | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.289.780

Não

RIO DE JANEIRO, 21 de Setembro de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br