



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes


Carina de Lima Pereira dos Santos

**Estudo da resposta celular e apresentação antigênica dos  
fibrócitos na infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonenses***

Rio de Janeiro  
2012

Carina de Lima Pereira dos Santos

**Estudo da resposta celular e apresentação antigênica dos fibrócitos na  
infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dra. Suzana Côrte-Real Faria

Coorientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos, Carina de Lima Pereira dos.

Estudo da resposta celular e apresentação antigênica dos fibrócitos na infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Carina de Lima Pereira dos Santos. – 2012. 98 f.

Orientadora: Suzana Côrte-Real Faria  
Coorientador: Jorge José de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. *Leishmania* – Teses. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Antígenos. 4. Sistema imunológico. I. Faria, Suzana Côrte-Real. II. Carvalho, Jorge José de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.993.162

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Carina de Lima Pereira dos Santos

**Estudo da resposta celular e apresentação antigênica dos fibrócitos na  
infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de setembro de 2012.

Coorientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Dra. Suzana Côrte-Real Faria (Orientadora)  
Fundação Instituto Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvana Allodi  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido, meus pais e irmãos pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos dessa trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Zalmi e Aurelina pela oportunidade de estudar e alcançar os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Clara e Júnior por sempre acreditarem no meu potencial e pelas palavras de força nos momentos difíceis.

Ao meu marido Josimar por ser um grande companheiro, paciente e amoroso.

A minha orientadora Dra Suzana Côrte-Real por ser mais que uma orientadora, ser uma amiga, uma mãe.

Ao meu co-orientador Dr Jorge José de Carvalho pela oportunidade de participar do programa de pós-graduação BHEX, pela atenção e pelo carinho.

Aos meus amigos e grandes companheiros de trabalho Camila e Roger, pelo que me ensinaram, pela ajuda nos experimentos e na dissertação.

A minha grande amiga Vanessa pelo companheirismo, carinho e dedicação.

A minha “aluna” Thaísa pela ajuda, confiança e carinho.

A minha amiga Andressa pela força quando eu mais precisei.

As minhas amigas Andressa Moraes, Janine, Fernanda e Andreia pelas palavras de incentivo e pelo carinho durante este período.

Aos amigos Alanderson e Francisco por sempre me ajudarem e torcerem por mim.

Aos amigos do Setor de Potência de Biomanguinhos, em especial, Roberta, Anderson, Carol, Glaucia e Carlos José por me incentivarem nos momentos de desânimo e por me substituírem nas atividades para que eu pudesse escrever.

A Dra Andreia Henriques Pons pela ajuda na análise dos experimentos de citometria de fluxo, pelo carinho e atenção.

A Dra Patrícia Bozza pela colaboração na utilização dos animais knockout em TLR-2.

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

## RESUMO

LIMA, Carina Pereira dos Santos. *Estudo da resposta celular e apresentação antigênica dos fibrócitos na infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Os fibrócitos foram inicialmente identificados pelo seu recrutamento rápido para os tecidos lesionados e por atuar diretamente na resposta imune através do reconhecimento, apresentação antigênica e produção de citocinas e quimiocinas. Segundo Grab (2004) fibrócitos podem participar da resposta imune na leishmaniose e por isso no presente estudo propomos analisar a resposta celular e apresentação antigênica dos fibrócitos na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Para os experimentos *in vivo* camundongos C57BL/6 e knockout para o receptor TLR-2 foram inoculados na derme auricular com  $10^5$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e 1, 7, 15 dias após a infecção as regiões de inóculo e os linfonodos foram retirados e processados para citometria de fluxo. Para os experimentos *in vitro* fibrócitos foram obtidos de mononucleares do sangue periférico de camundongos C57BL/6. Os fibrócitos foram avaliados quanto às suas características morfológicas e fenotípicas, infecção, expressão de MHC-II/B7-1/B7-2 e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. As análises na região de inóculo mostraram o aumento no percentual de fibrócito na derme de camundongos após 15 dias de infecção tanto em animais C57BL/6 quanto em animais KO TLR-2. Neste sítio, os fibrócitos produziram citocinas e expressaram MHC-II, B7-1 e B7-2 podendo participar da resposta imune. As análises no linfonodo mostraram a existência de um alto percentual de fibrócitos nos animais controle, contudo, após infecção este percentual foi reduzido. Após infecção verificamos que os fibrócitos de animais WT C57BL/6 foram capazes de produzir as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  durante o primeiro dia. Entretanto, na ausência de TLR-2 os fibrócitos presentes no linfonodo produziram TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que podem estar relacionadas com a ativação celular e aumento da capacidade de apresentação antigênica destas células durante a infecção. No linfonodo verificamos que os fibrócitos podem participar da apresentação antigênica após a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Contudo, nos linfonodos de animais WT C57BL/6 observamos a redução significativa no percentual destas células expressando MHC-II e B7-1, o que pode estar relacionada a presença do TLR-2. Nos ensaios *in vitro* fibrócitos de camundongos C57BL/6 apresentaram alta capacidade endocítica, eliminaram os parasitas nas primeiras 24 horas de infecção, expressaram MHC-II/B7-1/B7-2 e foram capazes de ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Com isso, nossos resultados sugerem que os fibrócitos podem atuar na resposta celular e na apresentação antigênica durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*, contudo estas funções podem ser moduladas pela participação do TLR-2 e pelo microambiente onde estes se encontram.

Palavras-chave: Fibrócito. *Leishmania*. Apresentação antigênica.

## ABSTRACT

Fibrocytes were initially identified by their fast recruitment to the injured tissues and by acting directly on the immune response through recognition, antigen presentation and production of cytokines and chemokines. According to Grab *et al.*, 2004 fibrocytes may participate in the immune response to leishmaniasis and therefore, in this study we propose to examine the cellular response and antigen presentation of fibrocytes in infection by *L. (L.) amazonensis*. *In vivo* experiments C57BL/6 and knockout receptor TLR-2 animals were inoculated in the ear dermis with  $10^5$  promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and 1,7, 15 days after infection ears and lymph nodes were removed and processed for flow cytometry. For *in vitro* experiments peripheral blood fibrocytes from C57BL/6 mice were evaluated for their morphological and phenotypic, MHC-II/B7-1/B7-2 expression and ability to activate CD4<sup>+</sup> T cells. The analyses in the inoculum region showed significant increase in the percentage of fibrocyte in the C57BL/6 and TLR-2 knockout mice after 15 days of infection. At this site fibrocytes part of the immune response by cytokines production and MHC-II, B7-1 and B7-2 expression. The analyses in the lymph node showed the existence of a high percentage of fibrocytes in the control animals, however, after infection, this percentage was reduced. After infection it was verified that the fibrocytes of C57BL/6 were able to produce cytokines IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  during the first days. However, in the absence of TLR-2 fibrocytes in the lymph produced TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  that may be related to cell activation and increased antigen presentation capacity of these cells during infection. In the lymph node it was found that fibrocytes may participate in antigen presentation after infection with *L. (L.) amazonensis*. However, in lymph nodes of mice C57BL/6 it was observed the significant reduction in the percentage of those cells expressing MHC-II, B7-1, which can be related to the presence of the TLR-2. *In vitro* fibrocytes of C57BL/6 showed high endocytic capacity, eliminating the parasites within the first 24 hours after infection, and expressed MHC-II/B7-1/B7-2 being were able to activate CD4 + T cells. Thus, our results suggest that fibrocytes may act in cellular response and antigen presentation during infection by *L. (L.) amazonensis*, however these functions can be modulated by the involvement of TLR-2 and the in microenvironment.

Keywords: Fibrocyte. *Leishmania*. Antigen presentation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático da diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas.....	14
Figura 2	Desenho esquemático das moléculas expressas e produzidas pelos fibrócitos.....	17
Figura 3	Ciclo evolutivo de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> .....	28
Figura 4	Avaliação quantitativa das células parasitadas e da carga parasitária presente no 15º dia de infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	43
Figura 5	Identificação dos fibrócitos na população total de células da região auricular.....	47
Figura 6	Avaliação do percentual de fibrócitos na região auricular.....	48
Figura 7	Análise do percentual de fibrócitos expressando TLR-2 no sítio de lesão.....	49
Figura 8	Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-4, IL- 10 e TGF- $\beta$ no sítio de lesão.....	50
Figura 9	Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ no sítio de lesão por citometria de Fluxo.....	51
Figura 10	Análise do percentual de fibrócitos expressando MHC-II, B7-1 e B7-2 no sítio de lesão.....	53
Figura 11	Identificação dos fibrócitos na população total de células do linfonodo drenante.....	57
Figura 12	Avaliação do percentual de fibrócitos no linfonodo drenante.....	58
Figura 13	Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ no linfonodo drenante.....	59
Figura 14	Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ no linfonodo drenante por citometria de Fluxo.....	60
Figura 15	Análise do percentual de fibrócitos expressando MHC-II, B7-1 e B7-2 no linfonodo drenante .....	62
Figura 16	Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia de luz.....	64

Figura 17	Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão.....	65
Figura 18	Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos.....	66
Figura 19	Análise da infecção de fibrócitos com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	69
Figura 20	Análise do percentual de fibrócitos infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	70
Figura 21	Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão após infecção com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	71
Figura 22	Caracterização fenotípica da cultura primária de fibrócitos após infecção com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	72
Figura 23	Análise ultra-estrutural da expressão de TLR-2 em fibrócitos.....	73
Figura 24	Análise da expressão de MHC-II, B7-1 e B7-2 em cultura primária de fibrócitos.....	75
Figura 25	Análise da expressão de MHC-II, B7-1 e B7-2 em cultura primária de fibrócitos infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	76
Figura 26	Análise da ativação de linfócitos CD4 <sup>+</sup> por fibrócitos.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CCR	Receptor para quimiocina
CD	Cluster of Differentiation
CLIP	Peptídeo associado à cadeia invariante
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CTLA-4	Antígeno 4 de Linfócitos Citotóxicos
CXCR	Receptor para quimiocina
F4/80	Antígeno presente em macrófagos
Fc $\gamma$ R	Receptor para porção Fc das imunoglobulinas
FITC	Fluoresceinisothiocyanate ou isotiocinato de fluoroceína
GM-CSF	Fator estimulador de colônia Granulócito Macrófago
Gp63	Glicoproteína 63
GPL	Lipofosfoglicano
Gr1	Antígeno presente na série granulocítica
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
KO	Knockout - nocautes
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo Difusa

LFA-1	Antígeno 1 Associado a Função de Linfócitos
LMC	Leishmaniose Muco-cutânea
LSP1	Proteína 1 Específica de Linfócito
LTC	Linfócito T Citotóxico
MHC-I	Complexo de Histocompatibilidade do Tipo I
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade do Tipo II
NF <sub>κ</sub> B	Fator de Transcrição nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina fosfatada
PFA	Paraformaldeído
PPR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
ROS	Intermediários Reativos de Oxigênio
SAP	Soro Amilóide P
SFB	Soro Fetal Bovino
TAP	Proteína Transportadora de antígenos
TCR	Receptor de Célula T
TGF	Fator Transformador de Crescimento
TLR	Receptores Toll-“Like”
TRITC	Isotiocianato de Tetrametilrodamina
WT	Wild Type - selvagem
μl	Microlitros

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
1.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>32</b>
1.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
2	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
2.1	<b>Animais.....</b>	<b>33</b>
2.2	<b>Parasitas.....</b>	<b>33</b>
2.3	<b>Infecção dos camundongos com <i>Leishmania (L) amazonensis</i>.....</b>	<b>34</b>
2.4	<b>Obtenção das orelhas e linfonodos.....</b>	<b>34</b>
2.5	<b>Processamento das lesões para a contagem da infecção por microscopia de luz.....</b>	<b>34</b>
2.6	<b>Processamento para citometria de fluxo.....</b>	<b>35</b>
2.7	<b>Cultura primária de fibrócitos do sangue periférico.....</b>	<b>36</b>
2.8	<b>Cultivo e manutenção dos fibrócitos obtidos de sangue periférico..</b>	<b>36</b>
2.9	<b>Infecção das culturas primárias de fibrócitos com <i>Leishmania (L) amazonensis</i>.....</b>	<b>37</b>
2.10	<b>Quantificação <i>in vitro</i> da infecção de fibrócitos por <i>Leishmania (L) amazonensis</i>.....</b>	<b>37</b>
2.11	<b>Processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>37</b>
2.12	<b>Processamento para imunocitoquímica ultra-estrutural.....</b>	<b>38</b>
2.13	<b>Processamento para microscopia de fluorescência.....</b>	<b>38</b>
2.14	<b>Ensaio de ativação dos linfócitos T CD4+.....</b>	<b>39</b>
2.14.1	<b><u>Obtenção dos linfócitos</u>.....</b>	<b>39</b>
2.14.2	<b><u>Ensaio de ativação dos linfócitos</u>.....</b>	<b>40</b>
2.15	<b>Análise estatística.....</b>	<b>41</b>
3	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
3.1	<b>Análise macroscópica do sítio de infecção.....</b>	<b>42</b>
3.2	<b>Análise quantitativa das células parasitadas e da carga parasitária presente no 15º dia de infecção por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>...</b>	<b>42</b>
3.3	<b>Estudo da resposta celular de fibrócitos no sítio de infecção dos camundongos infectados com promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</b>	<b>44</b>

3.4	<b>Análise da apresentação antigênica de fibrócitos no sítio de lesão em camundongos infectados com promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</b>	52
3.5	<b>Estudo da resposta celular de fibrócito no linfonodo drenante em camundongos infectados com promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</b>	54
3.6	<b>Análise da apresentação antigênica de fibrócitos no linfonodo drenante de camundongos infectados com promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</b>	61
3.7	<b>Estudo <i>in vitro</i> dos fibrócitos obtidos de cultura primária do sangue periférico.....</b>	63
3.7.1	<b><u>Caracterização morfológica e fenotípica dos fibrócitos.....</u></b>	63
3.7.2	<b><u>Análise da infecção do fibrócitos por formas promastigota de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....</u></b>	67
3.7.3	<b><u>Avaliação da expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (B7-1 e B7-2) em cultura de fibrócitos.....</u></b>	74
3.7.4	<b><u>Ensaio de ativação de linfócitos T CD4+ após co-cultivo com fibrócitos..</u></b>	77
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	79
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	86
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	87

## INTRODUÇÃO

### Fibrócitos

Os fibrócitos podem ser definidos como células derivadas de monócitos que apresentam características inflamatórias dos macrófagos e as propriedades de remodelamento tecidual dos fibroblastos (QUAN *et al.*, 2004; REILKOFF; BUCALA; HERZOG, 2011). Estas células foram descritas inicialmente em 1994 quando Bucala e colaboradores estudavam um modelo de cura de lesões. Neste modelo, foi realizada a implantação de uma esponja de polivinil-álcool no tecido subcutâneo de camundongos para observar os principais tipos celulares envolvidos no processo de reparo tecidual. Neste estudo foi mostrado um rápido influxo de células do sangue periférico, entre elas neutrófilos, monócitos e linfócitos. Além destas, foi observado um influxo de células fusiformes, semelhantes a fibroblastos. A presença destas células foi coincidente com a entrada de células inflamatórias pela circulação, sugerindo que estas pudessem ter origem no sangue periférico. Após cultivo das células do sangue, foi confirmada a existência de um tipo celular semelhante aos fibroblastos, produtores de proteínas de matriz extracelular, mas que apresentavam marcadores de leucócitos (CD45) e de células progenitoras (CD34). Esta nova sub-população celular foi então chamada de “fibrócito” a partir da combinação entre o radical grego “kitos” que significa célula e o radical “fibro” denotação do latim que significa fibra (BUCALA *et al.*, 1994; revisto por QUAN *et al.*, 2004).

### Origem monocítica dos fibrócitos

Embora a identificação dos fibrócitos tenha ocorrido em 1994 por Bucala, sua origem foi definida somente em 2001 quando Abe e colaboradores demonstraram que estes podem ser originados a partir de uma sub-população de monócitos, conhecida como CD14<sup>+</sup> em humano e Ly6C<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> em camundongos.

Os monócitos têm origem a partir de células-tronco hematopoiéticas quando estas dão origem a duas células progenitoras conhecidas como progenitora mielóide comum (CMP) e progenitora de granulócitos macrófagos (GMP). Estas por sua vez, dão origem às células progenitoras de macrófagos e dendríticas (PMDs) que geram as duas diferentes subpopulações de monócitos,  $\text{Ly6C}^+$  e  $\text{Ly6C}^-$  que migram da medula para o sangue periférico. Os monócitos  $\text{Ly6C}^+$  podem tanto diferenciar-se em monócitos  $\text{Ly6C}^-$  em condições não inflamatórias, quanto entrar nos tecidos e dar origem aos macrófagos e células dendríticas em condições inflamatórias. Já os monócitos  $\text{Ly6C}^-$  entram nos tecidos e geram macrófagos em condições não inflamatórias (GEISSMANN *et al.*, 2003; IWASAKI; AKASHI, 2007; YONA; JUNG, 2009).

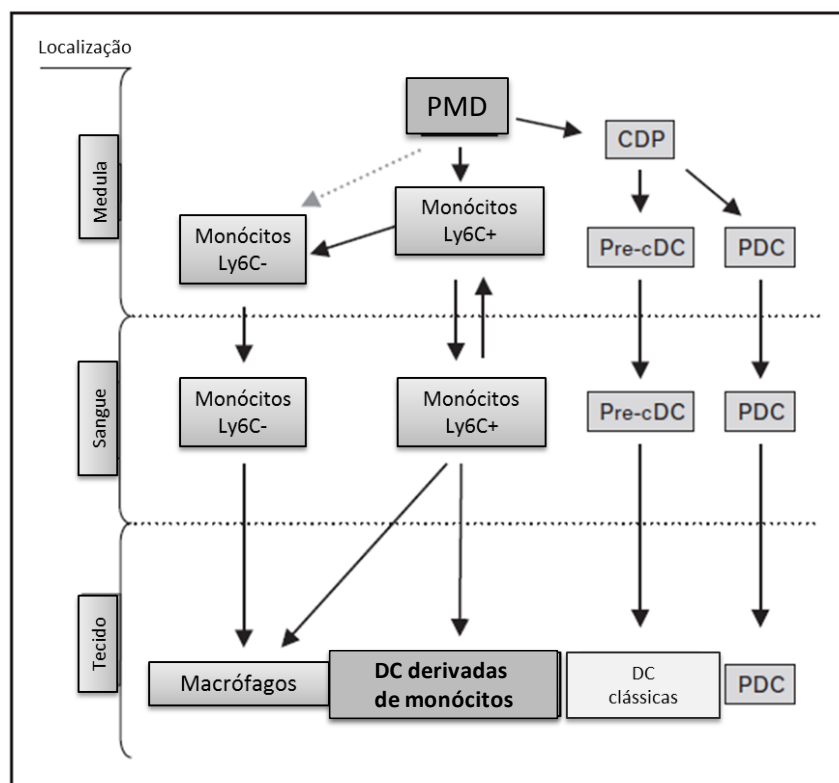


Figura 1: Desenho esquemático da diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas. Adaptado de YONA; JUNG, 2009.

Em camundongo as sub-populações de monócitos são identificados a partir da marcação de um grupo de proteínas expressas em sua superfície, entre elas CD115, CD11b, F4/80, Gr1 e Ly6C, sendo esta última considerada a mais



importante. O antígeno Ly6C é uma molécula ancorada a glicosilfosfatidilinositol também expressa em granulócitos, em células dendríticas e 40% das células natural killer (TAYLOR; GORDON, 2003; GEISSMANN *et al.*, 2008).

Os monócitos são classificados em dois grupos: monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>+</sup>) ou residentes (Ly6C<sup>-</sup>). Monócitos inflamatórios expressam Ly6C<sup>+</sup>, CD115, Gr1<sup>+</sup>, CD62L, CCR2 e são seletivamente recrutados para os tecidos inflamados e órgãos linfóides durante infecção ou dano tecidual (GEISSMANN *et al.*, 2003; SUNDERKOTTER *et al.*, 2004; SERBINA *et al.*, 2008). Por outro lado, os monócitos chamados de residentes apresentam tamanho menor, alta expressão do receptor para quimiocina CX3CR1, CD43, antígeno 1 associado à função de linfócitos (LFA-1) e não expressam Ly6C, Gr1, CCR2 ou CD62L. Eles são responsáveis por gerar macrófagos nos tecidos em homeostasia (GEISSMANN *et al.*, 2003; SUNDERKOTTER *et al.*, 2004). Estudos utilizando monócitos humanos e murinos tem demonstrado semelhanças entre as populações nos quais os monócitos murinos Ly6C<sup>+</sup> e Ly6C<sup>-</sup> correspondem aos monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> em humanos respectivamente (BURKE *et al.*, 2008).

A exposição de monócitos humanos e murinos ao fator estimulador de colônia granulócito/macrófagos (GM-CSF) e IL-4 induz a diferenciação em células dendríticas (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994; GEISSMANN *et al.*, 2008). Além disso, a adição do fator transformador de crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) confere aos monócitos o fenótipo de Células de Langerhans (GEISSMANN *et al.*, 1998; GEISSMANN *et al.*, 2010).

A diferenciação de monócitos em macrófagos é determinada pela presença do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). Entretanto, a adição de IFN- $\gamma$  ou lipopolissacarídeo induz a diferenciação destes em macrófagos com fenótipo M1 que exibem potentes propriedades microbidas, produzem IL-12 e promovem uma resposta mediada por linfócitos T helper do tipo 1 (Th1). Na adição de IL-4 os monócitos diferenciam-se em macrófagos com fenótipo M2 que induzem respostas mediadas por linfócitos T helper do tipo 2 (STEIN *et al.*, 1992; MARTINEZ *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2009;). Contudo, trabalhos *in vivo* têm demonstrado que a heterogeneidade dos monócitos pode influenciar nesta diferenciação, onde monócitos Gr1<sup>-</sup> Ly6C<sup>-</sup> diferenciam-se mais facilmente em macrófagos com fenótipo

M2 e monócitos Gr1<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> diferenciam-se mais facilmente em macrófagos M1 ou células dendríticas (GEISSMANN *et al.*, 2010).

Abe *et al.*, (2001) descreveram que monócitos humanos CD14<sup>+</sup> geram fibrócitos quando cultivados 10 a 14 dias na presença de soro ou 3 dias na ausência de soro. Reforçando a idéia da diferenciação a partir de monócitos, Niedermeier *et al.*, (2009) mostraram que monócitos Gr1<sup>+</sup>, CD115<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> obtidos do baço de camundongos geram fibrócitos quando cultivados por 15 dias na presença de soro ou 5 dias na ausência de soro. Contudo, há diversos fatores que afetam a diferenciação: cultivo com TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13, fator de crescimento derivado de plaquetas e linfócitos T aumentam a diferenciação de monócitos em fibrócitos (ABE *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2005; VARCOE *et al.*, 2006; PILLING *et al.*, 2006), enquanto que o cultivo com agregados de IgG, soro amilóide P (SAP) e citocinas pro-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-12, inibem a diferenciação (PILLING *et al.*, 2003; PILLING *et al.*, 2006; GOMER *et al.*, 2009 NIEDERMEIER *et al.*, 2009).

### Propriedades

Estudos têm expandido o conhecimento sobre os marcadores e funções atribuídas aos fibrócitos. Por muitos anos, foi utilizada como critério mínimo para identificação dos fibrócitos em culturas ou em cortes de tecidos, a produção de colágeno juntamente com a expressão de CD34 e ou CD45. No entanto, esta abordagem pode ser insuficiente em algumas situações, nas quais pode haver a sobreposição da expressão destes marcadores entre fibrócitos, macrófagos e fibroblastos. Assim, avaliações adicionais incluindo outros marcadores celulares, análise morfológica e a produção de proteínas de matriz extracelular são necessárias para identificar precisamente os fibrócitos em seu contexto biológico (QUAN *et al.*, 2004; PILLING, *et al.* 2006).

Consistente com sua origem na medula óssea, fibrócitos expressam marcadores de célula hematopoiética como CD45 e proteína 1 específica de linfócito (LSP1). Além disso, podem expressar marcadores presentes em diferentes tipos celulares: macrófagos (CD11b, CD11c, CD11d, CD10, CD13, receptores scavenger, receptores “Toll-Like” e receptores Fc), células progenitoras (CD34), células dendríticas (MHC-I, MHC-II e moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2) e fibroblastos (colágeno tipo I, II, III e IV e glicosaminoglicanos) (Fig 2) (PILLING *et al.*, 2006; REILKOFF; BUCALA; HERZOG, 2011).

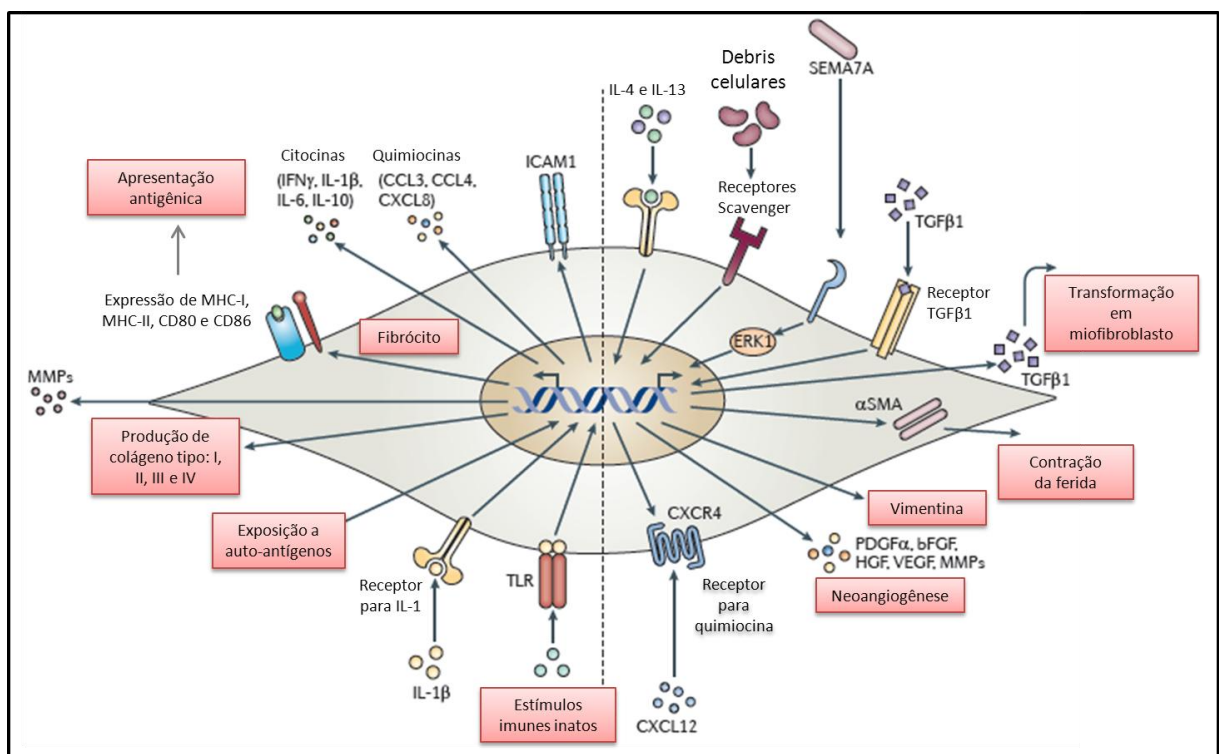


Figura 2: Desenho esquemático das moléculas expressas e produzidas pelos fibrócitos. Adaptado de REILKOFF; BUCALA; HERZOG, 2011).

### Plasticidade

Os fibrócitos podem se diferenciar em fibroblastos e miofibroblastos sendo esta diferenciação marcada pela regulação negativa nas moléculas CD45 e CD34 (BUCALA *et al.*, 1994; PILLING *et al.*, 2003; PILLING *et al.*, 2006; HONG *et al.*, 2007). Estudos demonstram que a diferenciação ocorre sob a influência de fatores

como TGF- $\beta$ 2 ou endotelina-1, os quais direcionam a diferenciação de fibrócitos em miofibroblastos, a partir da ativação das vias Smad 2/3 e SAPK/JNK MAPK . Estas por sua vez estimulam a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso (SCHMIDT *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007). Entretanto, outros fatores parecem estar envolvidos neste processo de diferenciação como as citocinas pro-fibróticas (IL-4 e IL-13) que promovem a diferenciação de monócitos em fibrócitos e de fibrócitos em miofibroblastos sem induzir proliferação. Além disso, a produção de citocinas anti-fibróticas como IFN- $\gamma$  pode inibir este processo de diferenciação (SHAO *et al.*, 2008). Além da diferenciação em miofibroblastos e fibroblastos estes podem se diferenciar também em adipócitos com acúmulo de lipídeos citoplasmáticos (HONG *et al.*, 2007).

### **Fibrócitos em processos patológicos**

Estudos realizados nos últimos 10 anos têm definido a participação dos fibrócitos nos processos patológicos por ser uma célula produtora de colágeno, com capacidade de migrar precocemente e se acumular nos tecidos lesionados. Neste contexto desempenham papel importante em processos inflamatórios e na fase proliferativa da cicatrização, através da produção de proteínas de matriz extracelular (REILKOFF; BUCALA; HERZOG, 2011).

Em quadros de asma, fibrócitos estão presentes no tecido brônquico após exposição ao alérgeno onde se diferenciam em miofibroblastos contráteis e atuam na produção de proteínas de matriz extracelular, podendo participar nos processos de inflamação e remodelamento tecidual (PHILLIPS *et al.*, 2004). Nas cardiomiopatias isquêmicas, os fibrócitos estão associados com o processo de reparo após a lesão (HERZOG; BUCALA, 2010).

Estudos em camundongos infectados com *Schistosoma japonicum* demonstraram a presença de fibrócitos nas áreas de formação do granuloma, podendo estar atuando na produção de proteínas da matriz, o que sugere a participação destas células na infecção (CHESNEY *et al.*, 1998). Em modelos de estudo para a doença de Lyme, Grab *et al.*, (1999) demonstraram que fibrócitos não

se infectam pela *Borrelia burgdorferi*, contudo permitem a ligação das bactérias com invaginações de suas membranas formando um reservatório que as protege do sistema imune (GRAB *et al.*, 1999).

Em doenças auto-imunes como a esclerodermia que é caracterizada por uma progressiva fibrose dérmica e visceral, os fibrócitos parecem estar envolvidos na fibrose dos diversos órgãos afetados (VARCOE *et al.*, 2006).

Além da participação dos fibrócitos em doenças auto-imunes, estudos recentes têm sugerido o papel destes na imunidade, no reconhecimento de antígenos e na apresentação antigênica, podendo desempenhar um importante papel na ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa (CHESNEY *et al.*, 1997; BALMELLI *et al.*, 2005).

## **Sistema imune- visão geral**

### Imunidade inata

O sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores externos, sejam esses biológicos, ou químicos e é conceitualmente dividido em imunidade inata e adaptativa (DELVES; ROITT, 2000). A imunidade inata é caracterizada por ser uma resposta rápida que consiste em mecanismos de defesa bioquímicos (proteínas solúveis) e biológicos (células fagocíticas) que já existiam antes do aparecimento de uma infecção (DELVES; ROITT, 2000; MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os fagócitos são células que atuam rapidamente no reconhecimento e internalização de antígenos nos momentos iniciais da resposta, atuando na primeira linha de defesa do organismo (MOSSER; EDWARDS, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010). Estas expressam uma série de receptores envolvidos na endocitose de patógenos como receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (FcγRI/CD64, FcγRII/CD32 e FcγRIII/CD16), receptores scavenger, receptores para complemento e receptores

Toll-“Like” (GARCÍA-GARCÍA; ROSALES, 2002; JOSHI; BUTCHAR; TRIDANDAPANI, 2006; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

Os receptores Toll-“Like” (TLR) são considerados os mais importantes, sendo descritos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), pois reconhecem estruturas que são comuns a grupos de microorganismos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009; KAWAI; AKIRA, 2010).

O receptor Toll foi descrito inicialmente como um importante receptor de *Drosophila*, atuando no desenvolvimento dorso-ventral e na defesa contra infecções fúngicas e bacterianas (BEUTLER, 2002). Os TLRs são receptores glicoprotéicos transmembranares que pertencem à superfamília do receptor para IL-1 (IL-1R), apresentando um domínio extracelular com cadeias ricas em sequências de leucina, envolvido no reconhecimento de uma grande variedade de ligantes, um domínio transmembranar e um domínio intracelular semelhante ao domínio Toll/receptor IL-1 (TIR), envolvido na transdução de sinal e transcrição de genes via NF- $\kappa$ B com conseqüente produção de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA, 2003).

Os TLRs podem ser classificados em dois grupos, dependendo da sua localização celular e ligantes. Um grupo é constituído por TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR11, que são expressos nas superfícies celulares e reconhecem principalmente lipídeos como lipoproteínas e proteínas microbianas. O segundo grupo é composto de TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9, que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares como retículo endoplasmático, endossomas, lisossomas onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (TRINCHIERI; SHER, 2007; KAWAI; AKIRA, 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

A função primária dos PRRs é proporcionar uma proteção imediata contra patógenos invasores com a ativação das vias do sistema complemento, produção de citocinas, quimiocinas e fagocitose que coletivamente induzem a reação inflamatória aguda para agentes patogênicos (THOMA-USZYNSKI *et al.*, 2001; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Uma vez que o patógeno tenha sido fagocitado, este é mantido em um compartimento celular chamado de fagossoma que é acidificado e fusionado com lisossomas que contêm lisozimas e hidrolases ácidas capazes de degradar proteínas. Dados recentes têm mostrado a participação dos TLRs no momento da endocitose, e que estes são carregados para a membrana dos fagossomas, direcionando-os para maturação, acidificação e para a rota de

apresentação antigênica (PASARE; MEDZHITOV, 2004; HUYNH *et al.*, 2007; BLANDER, 2008). Além disso, esses receptores estão envolvidos na regulação da expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias em células dendríticas, que são células especializadas em capturar e apresentar antígenos aos linfócitos, consideradas uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN, 2006; THORNTON ; MORGAN, 2009).

### Resposta imune adaptativa

Ao contrário da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas e moléculas solúveis produzidas por linfócitos. As principais características desta resposta são: especificidade e diversidade de reconhecimento, resposta especializada, memória e tolerância aos componentes do próprio organismo (DELVES; ROITT, 2000). Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham um papel chave na sua ativação, a partir da apresentação de antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) (DELVES; ROITT, 2000; CRUVINEL *et al.*, 2010). A apresentação de antígenos pelas APCs gera os sinais necessários para a ativação dos linfócitos T. Essa interação determina a especificidade da resposta imune e depende da interação estrutural entre o receptor TCR dos linfócitos T e o peptídeo ligado a molécula de MHC na superfície das APCs (DEMPSEY; VAIDYA; CHENG, 2003; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008; HUGUES, 2010).

Existem vários tipos de linfócitos efetores, contudo existem dois subtipos principais, os linfócitos T auxiliares (T helper/Th) e citotóxicos (LTC), que apresentam o receptor TCR associado a uma molécula co-receptora CD4 ou CD8, respectivamente. Os linfócitos T CD4 são responsáveis pela orquestração de outras células do sistema imunológico em resposta a agentes patogênicos e também são muito importantes na ativação de macrófagos, linfócitos B ou até mesmo linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão envolvidos principalmente em respostas antivirais e

em atividades anti-tumores (PARKIN; COHEN, 2001; CRUVINEL *et al.*, 2010; VAN DEN BERG; MOLINA-PARÍS; SEWELL, 2011).

Os linfócitos auxiliares (CD4<sup>+</sup>) são funcionalmente subdivididos pelo padrão de citocinas que eles produzem em resposta a um estímulo gerado por uma APC, podendo o linfócito precursor Th0 tornar-se um linfócito Th1, Th2 ou Th17, dependendo de diversos fatores, entre eles o perfil de citocinas presentes no ambiente no momento da ativação. Apesar de morfologicamente indistinguíveis, essas células secretam diferentes perfis de citocinas e apresentam diferentes respostas efectoras (BRADLEY, 2003; HIRAHARA *et al.*, 2011).

Os linfócitos Th1 produzem grandes quantidades de interleucina 2 (IL-2), que induz a proliferação de linfócitos T de forma geral e aumenta a capacidade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Além disso, secretam grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , citocina importante na ativação de macrófagos infectados com agentes patogênicos intracelulares e na ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (PARKIN, COHEN, 2001). A segunda população de linfócitos importante é o Th2, que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 favorecendo a produção de anticorpos. As respostas Th2 são associadas a doenças alérgicas e infecções causadas por helmintos (BRADLEY, 2003). Os linfócitos Th17 representam uma nova sub-população de linfócitos T efetores importantes para a proteção contra infecções causadas por microorganismos extracelulares. Foram descritos inicialmente em modelos experimentais de doenças auto-imunes, e produzem citocinas como IL-22 e citocinas da família da IL-17 (MESQUITA *et al.*, 2009; DIACONU *et al.*, 2010; HIRAHARA *et al.*, 2011).

#### Processamento de antígenos, MHC e moléculas co-estimulatórias

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> reconhecem peptídeos ligados a moléculas de MHC-II presentes em células apresentadoras de antígenos, que são na sua maioria derivados de antígenos degradados em compartimentos endossomais (JORGENSEN; BUUS; NIELSEN, 2010).

As partículas são internalizadas em vesículas intracelulares denominadas endossomas, que se fundem com lisossomas contendo enzimas proteolíticas. A



vesícula resultante desta fusão é chamada fagolisossoma. O processo de degradação do antígeno ocorre em condições ácidas, que é o pH ótimo para ação das enzimas proteolíticas, e os peptídeos originados da degradação se ligam na fenda da molécula de MHC de classe II. Quando recém-sintetizada no retículo endoplasmático, a molécula do MHC-II tem a fenda de ligação protegida por uma proteína denominada cadeia invariante (Ii). Desse modo, a fenda do MHC-II não pode acomodar peptídeos presentes no retículo endoplasmático. Essa molécula de classe II é, então, direcionada para os fagolisossomas, onde se encontram os peptídeos exógenos resultantes da proteólise dos antígenos. Nos fagolisossomas, as enzimas proteolíticas digerem a cadeia Ii, porém não totalmente, restando o fragmento chamado peptídeo de classe II associado à cadeia invariante (CLIP). Com a remoção do CLIP, o peptídeo pode se ligar à fenda da molécula de MHC-II que é transportada para a superfície das APCs (RAMACHANDRA *et al.*, 1999; JORGENSEN *et al.*, 2010; LIAO; ARTHUR, 2011).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> detectam peptídeos derivados de patógenos intracelulares e proteínas próprias quando estas são apresentadas pelo complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) na superfície das células. Contudo, proteínas adquiridas por endocitose também podem ser expressas via MHC-I de uma forma alternativa conhecida como apresentação cruzada (NAIR; AMSEN; BLANDER, 2011).

Na via clássica, a apresentação de MHC-I ocorre quando proteínas virais, de outros microrganismos ou da própria célula são degradados em peptídeos por um complexo multiproteolítico denominado proteassoma. Estes peptídeos são transportados do citosol para o retículo endoplasmático rugoso por intermédio de uma proteína transportadora de antígeno (TAP). Estes peptídeos dentro do retículo endoplasmático rugoso se ligam a molécula de MHC-I nascente, tornando-a estável. O complexo peptídeo-MHC-I deixa o retículo endoplasmático e move-se para o complexo de Golgi, do qual são transportados para a superfície da célula (DONALDSON; WILLIAMS, 2009; NAIR; AMSEN; BLANDER, 2011).

Na apresentação cruzada, outras três vias são propostas para explicar como antígenos internalizados podem ser apresentados via MHC-I: Na via fagossoma-citosol acredita-se que antígenos derivados de microrganismos internalizados em fagossomas possam escapar para o citosol para serem quebrados pelo

proteassoma e seguirem o destino semelhante à via clássica do MHC-I. Na via fagossoma-retículo endoplasmático acredita-se que ocorra a fusão do fagossoma com retículo endoplasmático formando o chamado ERgossoma, que contém moléculas como TAP e MHC-I, fornecendo assim um ambiente ideal para apresentação cruzada. Com isso o antígeno pode escapar do Ergossoma, ser processado pelo proteassoma, transportado de volta pela TAP e ligado ao MHC-I. Na via vacuolar acredita-se que possa ocorrer a transformação direta do antígeno dentro do fagossoma por proteases, tais como catepsinas e que após a transformação os epítomos possam seguir a via clássica do MHC-I (BLANCHARD; SHASTRI, 2010; NAIR; AMSEN; BLANDER, 2011).

A ativação de linfócitos T naive requer não somente a ligação das moléculas de MHC ao receptor TCR, mas também a ligação de moléculas co-estimulatórias, cuja expressão é reservada a células apresentadoras de antígenos para fornecer sinais adicionais durante a ativação de linfócitos. Isto constitui uma barreira contra a ativação de linfócitos T que reconheçam peptídeos próprios expressos em moléculas de MHC (WING; SAKAGUCHI, 2010).

As moléculas co-estimulatórias compreendem a família B7: B7-1, B7-2, ICOS-L, PD-L1, PD-L2, B7-H3, e B7-H4, glicoproteínas transmembranares do tipo I da família das imunoglobulinas (TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011). Embora várias moléculas sejam descritas por fazer parte desta família as moléculas B7-1(CD80) e B7-2 (CD86) são as mais estudadas até o momento. B7-2 é constitutivamente expresso e regulado positivamente após a ativação celular, enquanto que a expressão de B7-1 é induzida após o aumento na expressão de B7-2. Ambos B7-1 e B7-2 têm dupla especificidade para os receptores CD28 e antígeno 4 de linfócitos citotóxicos (CTLA-4/CD152) presentes na superfície dos linfócitos T (SHARPE; FREEMAN, 2002; WANG; CHEN, 2004).

### **Participação do fibrócito nas respostas imunes**

Balmelli et al (2008) sugeriram que os fibrócitos podem participar da primeira linha de defesa contra patógenos invasores, pois são encontrados rapidamente em

tecidos lesionados, respondendo a estímulos com ligantes de TLRs 2, 4, 7 ou 3 e helicases citoplasmáticas, levando assim a uma rápida translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e produção de citocinas como a IL-6. Além disso, estas células expressam receptores para porção Fc das imunoglobulinas (BELLINI, MATOLI, 2007), endocitam e degradam antígenos de forma eficiente (BALMELLI *et al.*, 2005). Chesney *et al* (1997) descreveram que os fibrócitos podem desempenhar um importante papel na iniciação da imunidade antígeno-específica quando utilizaram o modelo de infecção com toxóide tetânico. Neste foi observado que os fibrócitos expressam todas as proteínas de superfície necessárias para apresentação antigênica incluindo MHC de classes I e II, moléculas co-estimulatórias como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), bem como moléculas de adesão CD11a, CD54 e CD58 sendo potentes estimuladores de linfócitos T CD4+ antígeno-específico *in vitro* após infecção com toxóide tetânico. Além disso, estes pesquisadores incubaram fibrócitos *in vitro* com proteínas do HIV (p-24 ou gp120) e inocularam estas células em uma lesão cutânea no camundongo, onde foram capazes de migrar para os linfonodos drenantes e ativar linfócitos T específicos. Balmelli *et al* (2005) estudaram a capacidade do fibrócito em estimular respostas em linfócitos T citotóxicos usando um modelo clássico de infecção pelo vírus da peste suína. Neste trabalho, descreveram que após a infecção, os fibrócitos passam a exibir características semelhantes às das células dendríticas, apresentando elevada capacidade endocítica e expressando moléculas para apresentação antigênica. Fibrócitos infectados com os vírus induzem a proliferação de linfócitos com uma eficiência comparável a das células dendríticas derivadas de monócitos, demonstrando eficiência na apresentação de antígenos ligados ao MHC-I.

A partir do conhecimento sobre a capacidade do fibrócito em atuar como célula apresentadora de antígenos, produzir citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular Grab *et al.*, 2004 sugeriu a participação destas células na resposta imune a parasitas do gênero *Leishmania* e que estes poderiam ter relação com os diferentes perfis de resposta imune observados na leishmaniose.

## Leishmaniose

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças tropicais, sendo incluída no grupo de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde. Está presente em 88 países onde cerca de 350 milhões de pessoas vivem sob risco de desenvolver uma das formas da doença (OMS, 2011). É causada pela infecção com protozoários do gênero *Leishmania*, que mantêm seu ciclo de vida através da transmissão entre um inseto (flebotomíneo) e hospedeiros mamíferos (KEDZIERSKI, 2010).

Esta doença apresenta diferentes modalidades clínico-epidemiológicas, podendo ser agrupadas basicamente em 2 categorias: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar. A leishmaniose visceral tem como agentes etiológicos *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Novo Mundo e a *Leishmania (Leishmania) donovani* no Velho Mundo. A leishmaniose tegumentar abrange três formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), a forma mais comum, causada por diferentes espécies de *Leishmania* como por exemplo *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania (viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no Novo Mundo; leishmaniose mucocutânea (LMC), que tem como principal agente patogênico a *Leishmania (Viannia) braziliensis*; Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), cujo agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (revisto por GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No Brasil a *L. (L.) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar e apresenta um amplo espectro da doença (BARRAL *et al.*, 1991). Dados recentes indicam que a *L. (L.) amazonensis* está aumentando sua distribuição geográfica, sendo responsável por apresentações clínicas incomuns em novas áreas de transmissão (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007).

Os vetores da leishmaniose são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo os gêneros mais comumente observados, *Phlebotomus* como vetores das

leishmanioses do Velho Mundo e *Lutzomyia* como vetores das espécies de *leishmanias* do novo mundo (SHAW; LAINSON, 1987, GRIMALDI et al. 1991).

### O parasito

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor, e outra com flagelo contido em bolsa flagelar ou amastigota, observada nas células presentes nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BATES; ROGERS, 2004).

A transmissão das *Leishmanias* ocorre quando o inseto vetor se alimenta do sangue de indivíduos contaminados, ingerindo macrófagos contendo as formas amastigotas em seu interior ou amastigotas livres no tecido. No trato digestório do inseto vetor as amastigotas passam a forma promastigota procíclica, aderindo ao epitélio do intestino do flebotomíneo. Após ciclos de divisões, as formas promastigotas procíclicas se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas que migram para a cavidade bucal do inseto sendo inoculadas na derme do hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo, juntamente com imunomoduladores e vários componentes salivares. As formas promastigotas metacíclicas são então endocitadas por células presentes na derme, principalmente as 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 permitindo a reinfecção de outros macrófagos presentes no sítio de infecção como também do inseto vetor no momento de um novo repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011).

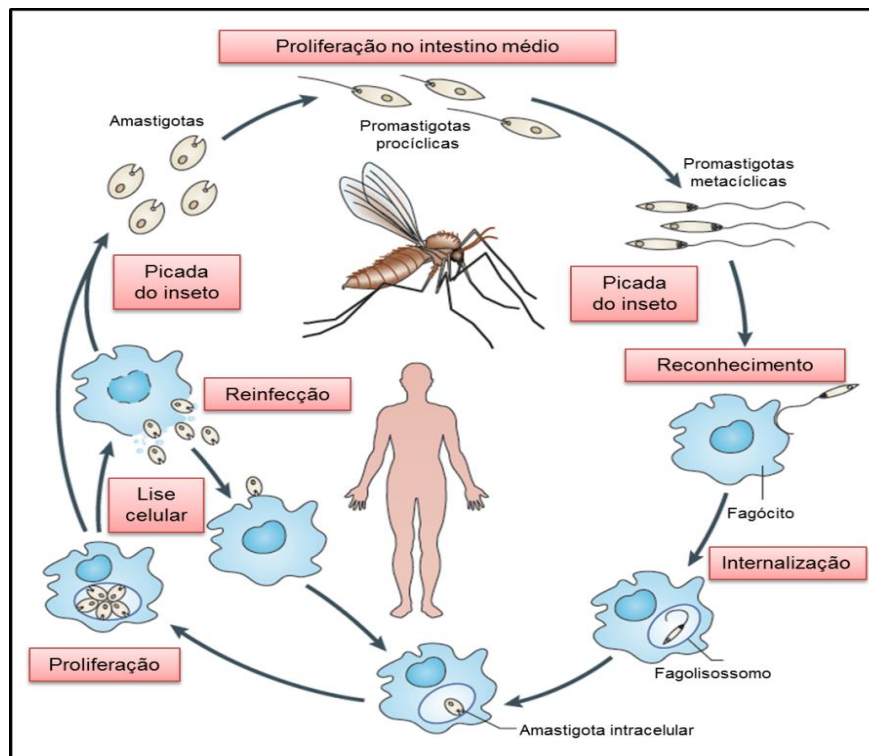


Figura 3: Ciclo evolutivo de protozoários do gênero *Leishmania* (Adaptado de KAYE; SCOTT, 2011).

Trabalhos recentes têm sugerido um mecanismo de escape realizado pela *Leishmania major*, no qual, ao entrar no hospedeiro as formas promastigotas podem ser fagocitadas pelos neutrófilos. Estas células são as primeiras a migrar para o sítio de infecção e capturam os parasitos de forma eficiente, contudo não os eliminam e, em vez disso, entram em apoptose e são então fagocitadas pelos macrófagos, facilitando a infecção por permitir a entrada silenciosa dos parasitos nos macrófagos (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; LASKAY *et al.*, 2008).

Embora estes estudos mostrem diferenças na entrada inicial do parasito, sua replicação é bem definida por ocorrer no fagolisossoma dos macrófagos. Este é um ambiente hostil, pois estas células são especializadas na destruição de potenciais agentes patogênicos. Além disso, uma das principais funções dos macrófagos é iniciar a resposta imune. Por isso os parasitos do gênero *Leishmania* tiveram que desenvolver mecanismos satisfatórios para a sua manutenção no interior dos fagolisossomos e reprimir as funções normais dos macrófagos (NYLÉN; GAUTAM, 2010).

## Resposta imune a *Leishmania*

Uma vez que a *Leishmania* esta bem estabelecida no interior de fagolisossomos dos macrófagos, ela interfere em um grande número de funções, particularmente a secreção de quimiocinas quimiotáticas. Isto se dá pela repressão de genes, com modificação pós-traducional, degradação de proteínas e pela ativação de vias e moléculas supressivas, especificamente da tirosina fosfatase, que se associa com a ativação de inúmeras vias metabólicas em diversos grupos de células e microorganismos. Embora evitar os mecanismos microbicidas iniciais dos macrófagos seja muito importante para a sobrevivência do parasita, este pode também modular outras funções como produção de citocinas, apresentação de antígenos e ativação de linfócitos (RACOOSIN; BEVERLEY, 1997; MATTE; OLIVIER, 2002; GREGORY; OLIVIER, 2005). Os macrófagos produzem moléculas altamente reativas que são destrutivas para a *Leishmania* como óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (ROI) (REINER; LOCKSLEY, 1995; GALLOIS et al. 2001; HORTA *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* mostraram que a produção de ROI por macrófagos é prejudicial à sobrevivência do parasita nos fagolisossomos, contudo a *Leishmania* pode inibir a produção desta molécula e isto parece ocorrer devido a atividade das proteínas quinases C resultante da interação entre os macrófagos e moléculas de superfície do parasita como os lipofosfoglicanos (GPL) e ou gp63 (BUCHMULLER-ROUILLER; MAUEL, 1987; OLIVIER; BROWNSEY; REINER, 1992; DESCOTEAUX; TURCO, 1999; GREGORY; OLIVIER, 2005). A habilidade dos macrófagos em gerar NO é dependente do equilíbrio entre uma variedade de fatores imunes adicionais, como produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que determinarão o caráter da resposta imune (FIORENTINO *et al.*, 1991; BOGDAN; GESSNER; ROLLINGHOFF, 1993). Na fase inicial da infecção por *Leishmania* os macrófagos estimulados por IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  produzem baixas concentrações de NO, sendo este insuficiente para matar o parasito. No entanto, o NO produzido age de maneira autócrina induzindo os macrófagos a liberar IL-12 a qual estimula os linfócitos T e as células NK a produzirem grandes quantidades IFN- $\gamma$  (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008). A liberação de IFN- $\gamma$  ativa a enzima óxido nítrico

sintase indutível (iNOS) dos macrófagos, levando à produção de grandes quantidades de NO, suficiente para matar o parasito (DIEFENBACH et al. 1999, MURRAY; DELPH-ETIENNE, 2000). Entretanto, os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam diversos mecanismos que interferem na produção de NO pela célula hospedeira, incluindo a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, indução da liberação de citocinas anti-inflamatórias e redução da atividade da iNOS (CUNNINGHAM; 2002).

O desenvolvimento de uma resposta imune eficaz à *Leishmania* requer a apresentação de antígenos pelos fagócitos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e esta interação determina a especificidade da resposta imune. As células dendríticas são as células mais especializadas nesta função, contudo os macrófagos também apresentam antígenos via MHC-II, resultando na ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com aumento recíproco das atividades microbicidas. A apresentação de antígenos via MHC-I leva à ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que também apresentam papel importante na resposta imune protetora a *Leishmania* em algumas situações, mas ao contrário da apresentação via MHC-II não é essencial para a eliminação do parasito (HUBER; TIMMS; MAK, 1998; LOCKSLEY et al 1993; UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004).

Os parasitas do gênero *Leishmania* podem interferir na apresentação antigênica de várias maneiras. Essa interferência na apresentação de antígenos via MHC-II parece estar relacionada as diferenças naturais existentes entre as espécies de *Leishmania* e a forma evolutiva apresentada pelo parasita. Formas promastigotas metacíclicas permitem apresentação de antígenos via MHC-II de forma transitória, enquanto que formas amastigotas interferem quase que totalmente no carregamento dos antígenos (COURRET *et al.*, 1999). Estudos demonstram que a infecção de macrófagos por *Leishmania donovani* inibe a expressão de MHC I e II normalmente induzida pela produção de IFN. Em contraste, macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* expressam níveis normais de MHC-II, mas sofrem interferências no carregamento dos antígenos (REINER; NG; MCMASTER, 1987; REINER et al. 1988; PRINA et al. 1993; FRUTH; SOLIOZ; LOUIS, 1993). Além disso, as vias co-estimulatórias (B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4) contribuem de forma variada para os perfis de resposta imune observados nas leishmanioses, dependendo principalmente da espécie de *Leishmania* envolvida (SHARPE;



FREEMAN, 2002; WANG; CHEN, 2004; TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011).

As células apresentadoras de antígenos têm sido alvo de intensas investigações a fim de compreender os mecanismos envolvidos na resposta inicial, através do reconhecimento dos parasitos, na apresentação de antígenos e na ativação de linfócitos para os diferentes perfis observados nesta doença. Embora seja conhecido que os fibrócitos estejam nos tecidos logo após a lesão e que são capazes de apresentar antígenos, nada se sabe sobre a participação destas células na resposta a parasitos do gênero *Leishmania*, e se a sinalização via TLRs pode modular esta função.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo Geral

- Avaliar a resposta celular e capacidade de apresentação antigênica dos fibrócitos na infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

### 1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta celular de fibrócitos presentes no sítio de infecção e linfonodo drenante em camundongos C57BL/6 e camundongos knockout em TLR-2 durante a infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*.
- Estudar a capacidade dos fibrócitos em apresentar antígenos no sítio de infecção e no linfonodo drenante após a infecção experimental de camundongos C57BL/6 e camundongos knockout em TLR-2 por *L. (L.) amazonensis*.
- Analisar, *in vitro*, a infecção de fibrócitos obtidos a partir de culturas primárias do sangue periféricos de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) amazonensis*.
- Investigar, *in vitro*, a capacidade de fibrócitos em apresentar antígenos e ativar os linfócitos T CD4<sup>+</sup> após a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas com 6 a 8 semanas de vida da linhagem C57BL/6 obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/FIOCRUZ) sob a licença da CEUA LW-2/12, protocolo nºP-30/11-3. Os camundongos C57BL/6 knockout em TLR-2 foram cedidos pelo Dr. Shizuo Akira da Universidade de Osaka, Japão (Takeuchi et al. 1999) utilizados em colaboração com a Dra. Patrícia Torres Bozza do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Farmacologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz, sob o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) de nº 105/99. Os animais foram manipulados segundo as determinações estabelecidas pela Lei 11794/08 que dispõe sobre o uso científico de animais. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados n=5 animais por tempo analisado. Foram realizados 3 experimentos independentes.

### 2.2 Parasito

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, da cepa MHOM/BR/77/LTB0016, fornecidas pelo Dr. Gabriel Grimaldi do Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses – Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, RJ. 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 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) à temperatura de 26°C e utilizados na fase estacionária de crescimento até terceira passagem *in vitro*.

### **2.3 Infecção dos camundongos com *Leishmania (L.) amazonensis***

Os camundongos foram inicialmente anestesiados por via intraperitoneal com combinado de Compaz® (Diazepan 5 mg/mL) na dosagem de 5 mg/Kg e Fentanil® (Citrato de Fentanila 78,5 µg/10 mL) na dosagem 0,02 mg/Kg. Em seguida, foram inoculados por via intradérmica na região auricular externa com 10 µL de PBS (controle do veículo) e 10<sup>5</sup> promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em 10 µl de PBS.

### **2.4 Obtenção das orelhas e linfonodos**

Os camundongos com 1, 7 e 15 dias após a infecção e animais controle (não inoculados e inoculados com veículo por 1 dia) foram eutanasiados em número de cinco animais por grupo em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi realizado o procedimento cirúrgico para retirada da região auricular e dos linfonodos da região cervical. Foram realizados três experimentos independentes.

### **2.5 Processamento das lesões para a contagem da infecção por microscopia de luz**

As lesões retiradas nos diferentes tempos de infecção foram lavadas em PBS e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose por 1h a 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com Tetróxido de Ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose por 1h a 4°C. Em seguida, as lesões foram novamente lavadas em tampão cacodilato, desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídas em resina PolyBed 812. Após a polimerização, foram feitos cortes semi-finos, corados com azul de toluidina e eosina e observados

em microscópio de luz (Zeiss Axioplan 2) para análise das células parasitadas e da carga parasitária. A contagem foi realizada na área total dos cortes semi-finos.

## 2.6 Processamento para citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de identificar e quantificar os fibrócitos a partir das marcações CD45 e HSP-47, avaliar a expressão de MHC-II, moléculas co-estimulatórias (B7-1/B7-2), citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) e TLR-2 na derme auricular e linfonodos drenantes dos animais controle e dos diferentes tempos de infecção. As orelhas e linfonodos foram dissociadas com 0,1% Colagenase tipo I - (Sigma-Aldrich Co.) e 0,2% colagenase tipo II - (Sigma-Aldrich Co.) a 37°C, sob agitação. Após a dissociação, as células foram lavadas em PBS e incubadas por 20 minutos a 4°C em solução de bloqueio dos receptores Fc contendo 10% de soro de carneiro e 10% de SFB. Após o bloqueio, as células foram quantificadas e ajustadas para a concentração de  $10^6$  células/mL. As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C com anticorpos primários destinados a marcação externa anti-CD45 conjugado a FITC 1:200 (eBioscience), anti-MHC-II rato 1:200 (Southern), anti-B7-1 rato 1:200 (Southern) e anti-B7-2 rato 1:200 (Southern), anti-TLR-2 rato 1:20 (eBioscience), diluídos em PBS com 10% SFB. Em seguida, as células foram lavadas em PBS com 10% SFB e incubadas por 20 minutos com anticorpo secundário anti-rato conjugado a PE 1:100 (Southern) diluídos em PBS com 10% SFB. Após esta etapa, as células foram lavadas em PBS 10% SFB, fixadas em 1% PFA, permeabilizadas com 0,2% de saponina em PBS e incubadas por 20 minutos a 4°C com anticorpos primários destinados à marcação intracelular com anti-HSP47 (proteína relacionada a produção de colágeno) de coelho 1:50 (Santa Cruz Biotechnology), anti-IL-4 biotinilado 1:100 (BD Pharmingen), anti-IL-10 biotinilado 1:100 (BD Pharmingen), anti-IL-12 biotinilado 1:100 (BD Pharmingen), anti-IFN- $\gamma$  biotinilado 1:100 (BD Pharmingen), anti-TNF- $\alpha$  biotinilado 1:100 (BD Pharmingen), TGF- $\beta$  biotinilado 1:100 (BD Pharmingen). Após a marcação intracelular, as células foram lavadas em PBS com 0,2% de saponina, e incubadas por 20 minutos a 4°C com o anticorpo

secundário interno anti-coelho conjugado à SPRD 1:50 (Southern), e streptoavidina PE 1:50 (Southern), lavadas em PBS com 0,2% de saponina, pós-fixadas em 2% PFA, lavadas em PBS e avaliadas em citômetro CYAN ADP com a ajuda do software Summit (Dako cytometry) versão 4.3.

## **2.7 Cultura primária de fibrócitos do sangue periférico**

Para obtenção de fibrócitos a partir de mononucleares do sangue periférico os camundongos C57BL/6 foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca com solução anticoagulante de 3,8% citrato de sódio. Em seguida, o sangue foi diluído na proporção 1:1 em PBS, colocado sobre a solução de Ficoll-Histopaque<sup>®</sup> 1077 (Sigma-AldrichCo.) e centrifugado a 1800 RPM por 30 minutos a 20°C. As células foram separadas a partir da formação de um gradiente de concentração durante a centrifugação onde foi possível isolar a camada dos mononucleares. Os mononucleares isolados foram lavados em PBS e plaqueados em meio DMEM F-12 com 5% de soro fetal bovino.

## **2.8 Cultivo e manutenção dos fibrócitos obtidos de sangue periférico**

Após plaqueamento, as células foram mantidas por 24 horas em meio de cultivo DMEM F-12 com 5% de soro fetal bovino, 0,15% de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina em estufa na temperatura de 37 °C e em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Do 2º ao 20º dia de cultivo as células foram mantidas em meio DMEM F-12 na ausência de soro, o que propicia a diferenciação em fibrócitos. As células não aderentes foram removidas da cultura através da lavagem com PBS.

## **2.9 Infecção das culturas primárias de fibrócitos com *Leishmania (L.) amazonensis***

Fibrócitos cultivados durante 20 dias foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em meio DMEM F-12 na proporção de 10:1 parasito/célula em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas de interação, a cultura foi lavada com PBS e as células foram mantidas em cultivo ou processadas para as diferentes metodologias.

## **2.10 Quantificação *in vitro* da infecção de fibrócitos por *Leishmania (L.) amazonensis***

Para quantificação da infecção, os fibrócitos aderidos em lamínulas, não infectados e infectados por 2h, 6h, 24h, 48 horas foram fixados com Bouin, lavados em PBS e corados pelo corante de Giemsa. Foram realizados 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo e quantificadas 300 células por lamínula na objetiva de 63x em microscópio de campo claro (Zeiss).

## **2.11 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão- Rotina**

Para análise da morfologia, os fibrócitos aderidos em garrafas de 25cm<sup>2</sup> não infectados ou infectados por 2 horas foram fixados com glutaraldeído 2,5% por 1h a 4°C em 0,1M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose, lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas por 1h a 4°C com 1% de OsO<sub>4</sub> diluído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose e lavadas no mesmo tampão. 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% de acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC/FIOCRUZ.

## **2.12 Processamento para imunocitoquímica ultraestrutural**

Para avaliar a expressão e a participação do receptor TLR-2 na internalização do parasito, fibrócitos foram cultivados em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, infectados, lavados com PBS e fixados de forma branda com (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,05%) por 30 minutos a 4°C. Após este período as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo primário para TLR-2 rato (1:20) Santa Cruz em temperatura ambiente, lavadas e incubadas por 1 hora com o secundário anti-rato conjugado a ouro coloidal 10nm em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% por 1h a 4°C em 0,1M tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose, lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas por 1h a 4°C com 1% de OsO<sub>4</sub> diluído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose e lavadas no mesmo tampão. 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% de acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) pertencente à Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC/FIOCRUZ.

## **2.13 Processamento para microscopia de fluorescência - Marcação *in vitro* das culturas primárias**

Para a caracterização fenotípica dos fibrócitos e análise das moléculas requeridas para apresentação antigênica, as células aderidas em lamínulas não



infectadas ou infectadas por 24 horas foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 1 hora a 4°C. Em seguida as células foram lavadas com PBS + 1% de BSA, incubadas com anticorpos primários externos anti-CD45 conjugado a FITC 1:200 (eBioscience), anti-CD34 rato 1:50 (Santa Cruz Biotechnology), anti-MHC-II rato 1:200 (Southern), anti-B7-1 rato 1:200 (Southern) e anti-B7-2 rato 1:200 (Southern), diluídos em PBS + 1% de BSA por 24 horas em câmara úmida a 4°C. Após este período as células foram lavadas em PBS + 1% de BSA e incubadas com anticorpos secundários anti-rato alexa Fluor 488 1:1000 (eBioscience) por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em PBS + 1% de BSA, permeabilizadas com 0,5% Triton x-100 e incubados para marcação intracelular com anticorpo intracelular anti-HSP47 (proteína relacionada a produção de colágeno) coelho 1:50 (Santa Cruz Biotechnology) por 24 horas em câmara úmida a 4°C. Após este período as células foram lavadas em PBS 1% de BSA e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho TRITC 1:300 (eBioscience) por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Na sequência, as células foram novamente lavadas em PBS + 1% de BSA, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente com 10 µg/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma), em PBS. Após lavagem, as lamínulas foram montadas em 2,5% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano-trietilenodiamina - DABCO ("anti fading") e 50% de glicerol, pH 7,2, seladas e analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager M1 –Apotome, Zeiss.

## **2.14 Ensaio de ativação de linfócitos**

### **2.14.1 Obtenção dos linfócitos**

Os animais C57BL/6 foram inoculados na região perinatal com  $10^5$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Após 15 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e foi realizada a retirada do baço por procedimento cirúrgico para a obtenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Após sua retirada, os baços foram macerados formando uma suspensão celular. A essa suspensão celular

foi adicionado um volume igual de solução hemólise (ACK) e em seguida realizada a centrifugação a 300g por 5 minutos. Após a hemólise, as células foram quantificadas e separadas  $10^7$  células a cada 90 $\mu$ l de PBS. A cada 90 $\mu$ l de PBS contendo célula foram adicionados 10 $\mu$ l do anticorpo anti-CD4 conjugados a micro beads magnéticas mantidas por 15 minutos a 4°C. Após este período as células foram lavadas, e adicionadas à coluna de separação celular (Mini Macs) na presença do campo magnético. As células não marcadas foram eluídas da coluna e descartadas. Os linfócitos marcados com anti-CD4 retidos na coluna pela força magnética foram eluídos e quantificados após a retirada da coluna do campo magnético.

#### 2.14.2 Ensaio de ativação dos linfócitos

Para o co-cultivo foram utilizados fibrócitos obtidos de mononucleares do sangue aderidos em garrafas de 25cm<sup>2</sup> não infectados ou infectados por 24 horas. Os linfócitos foram adicionados à cultura de fibrócitos e mantidos em co-cultivo na proporção 10:1 linfócito/fibrócito por 72 horas em DMEM F-12 com 5% de soro fetal bovino, 0,15% de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina em estufa na temperatura de 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 horas, os linfócitos foram retirados do co-cultivo, lavados em PBS e incubados por 20 minutos a 4°C em solução de bloqueio dos receptores Fc contendo 10% de soro de carneiro e 10% de SFB. Após o bloqueio, os linfócitos foram quantificados e ajustados para a concentração de  $10^6$  células/mL. Os linfócitos foram incubados por 20 minutos a 4°C com anticorpos primários anti-CD4 conjugado a PerCP (eBioscience) 1:50, anti-CD44 (marcador de ativação) conjugado a PE (eBioscience) 1:50 diluídos em PBS com 10% SFB. Em seguida, os linfócitos foram lavados e fixados em 2% de PFA, lavados em PBS comum e avaliados em citômetro CYAN ADP com a ajuda do softwer Summit (Dako cytometry) versão 4.3.

## 2.15 Análise estatística

Todos os dados apresentados foram realizados em triplicata. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pela comparação entre os animais e moléculas analisadas utilizando teste t-student não pareado e Teste de Kruskal-Wallis (comparando selecionados pares de colunas). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software).

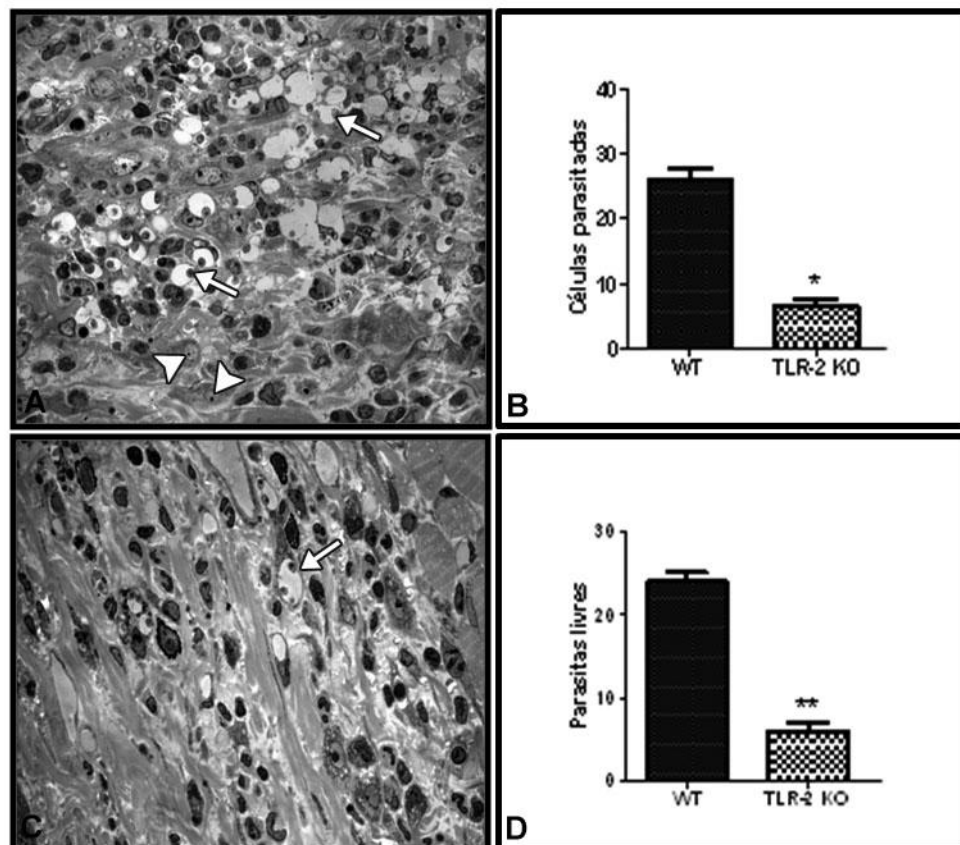
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise macroscópica do sítio de infecção

Os camundongos WT C57BL/6 inoculados somente com PBS apresentaram edema e aumento da vascularização da região auricular após o 1º dia de inóculo. Os camundongos inoculados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após o 1º dia de infecção apresentaram edema e aumento da vascularização na área de inóculo. A partir do 7º dia de infecção, os camundongos C57BL/6 apresentaram pequena mácula no sítio de infecção, enquanto que os camundongos KO TLR-2 apresentaram somente o aumento do edema e da vascularização. Após 15 dias, os camundongos C57BL/6 apresentaram pequena lesão e grande vascularização no sítio de infecção, diferente dos camundongos KO TLR-2 que apresentaram um nódulo endurecido na região do inóculo.

#### 3.2 Análise quantitativa das células parasitadas e da carga parasitária presente no 15º dia de infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*

Nos animais WT C57BL/6 observamos células parasitadas, contendo um número expressivo de amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos e amastigotas livres no tecido (Fig 4A). Diferente do encontrado em animais KO TLR-2 onde observamos a presença de um número inferior de células parasitadas contendo grandes vacúolos com amastigotas no interior e um pequeno número de amastigotas livres na matriz extracelular (Fig 4C). A contagem de parasitos livres e de células parasitadas foi expressa nas figuras 4B/D.



**Figura 4: Avaliação das células parasitadas e parasitas livres no 15º dia de infecção por *L. (L.) amazonensis*.** Cortes semi-finos da região auricular de camundongos C57BL/6 WT (A) e camundongos KO TLR-2 (C). Gráfico do número de células parasitadas (B) e da carga parasitária (D) no sítio de infecção de camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2. Teste t student não pareado \*  $p < 0,05$ , utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.

### 3.3 Estudo da resposta celular de fibrócitos no sítio de infecção dos camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

A identificação dos fibrócitos no sítio de infecção foi realizada através da dupla marcação de CD45 (marcador de leucócitos) e HSP-47 (proteína de choque térmico relacionada com a produção de colágeno tipo I) em ensaios de citometria de fluxo. Identificamos a população celular duplo positiva para CD45/HSP-47 no dot plot, que demarcamos com um quadrado (Fig 5D). A região celular para análise no dot plot do total de células (Fig 5A) foi escolhida a partir do retrogate da população duplo positiva no dot plot (Fig 5B). As amostras foram analisadas utilizando a região demarcada como duplo positiva dentro do histograma das diferentes marcações reveladas com PE (FL2) (Fig 5E).

Inicialmente avaliamos o percentual de fibrócitos presentes no sítio de infecção nos animais controle e inoculados somente com o PBS. Em ambos os animais foi verificado um pequeno número de fibrócitos correspondendo a menos de 0,2% do total de células (Fig 6A). Após a infecção dos camundongos WT C57BL/6 com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* verificamos um aumento do percentual de fibrócitos somente após o 15º dia, chegando a 1% das células no sítio de infecção (Fig 6B). Este aumento foi também observado nas análises do sítio de lesão dos camundongos KO TLR-2. Contudo, este aumento foi expressivamente maior quando comparado aos camundongos C57BL/6, alcançando 2% da população analisada (Fig 6B).

Para avaliar a resposta celular dos fibrócitos na resposta imunológica no sítio de lesão analisamos a capacidade de fibrócitos de animais WT C57BL/6 expressar receptores TLR-2 e a capacidade de fibrócitos de animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 produzir citocinas (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ).

Ao avaliarmos a expressão de TLR-2 em animais WT C57BL/6 observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando TLR-2 ao longo da infecção. Na ausência do inóculo 90% dos fibrócitos expressavam TLR-2, não havendo diferenças entre o animal não inoculado e o animal inoculado com o PBS. Contudo, após a infecção, verificamos uma redução expressiva do percentual de fibrócitos expressando TLR-2 a partir da primeira semana de infecção, onde

encontramos 45% de fibrócitos positivos para TLR-2 no 7º dia e 55% de fibrócitos positivos para TLR-2 no 15º dia (Fig 7).

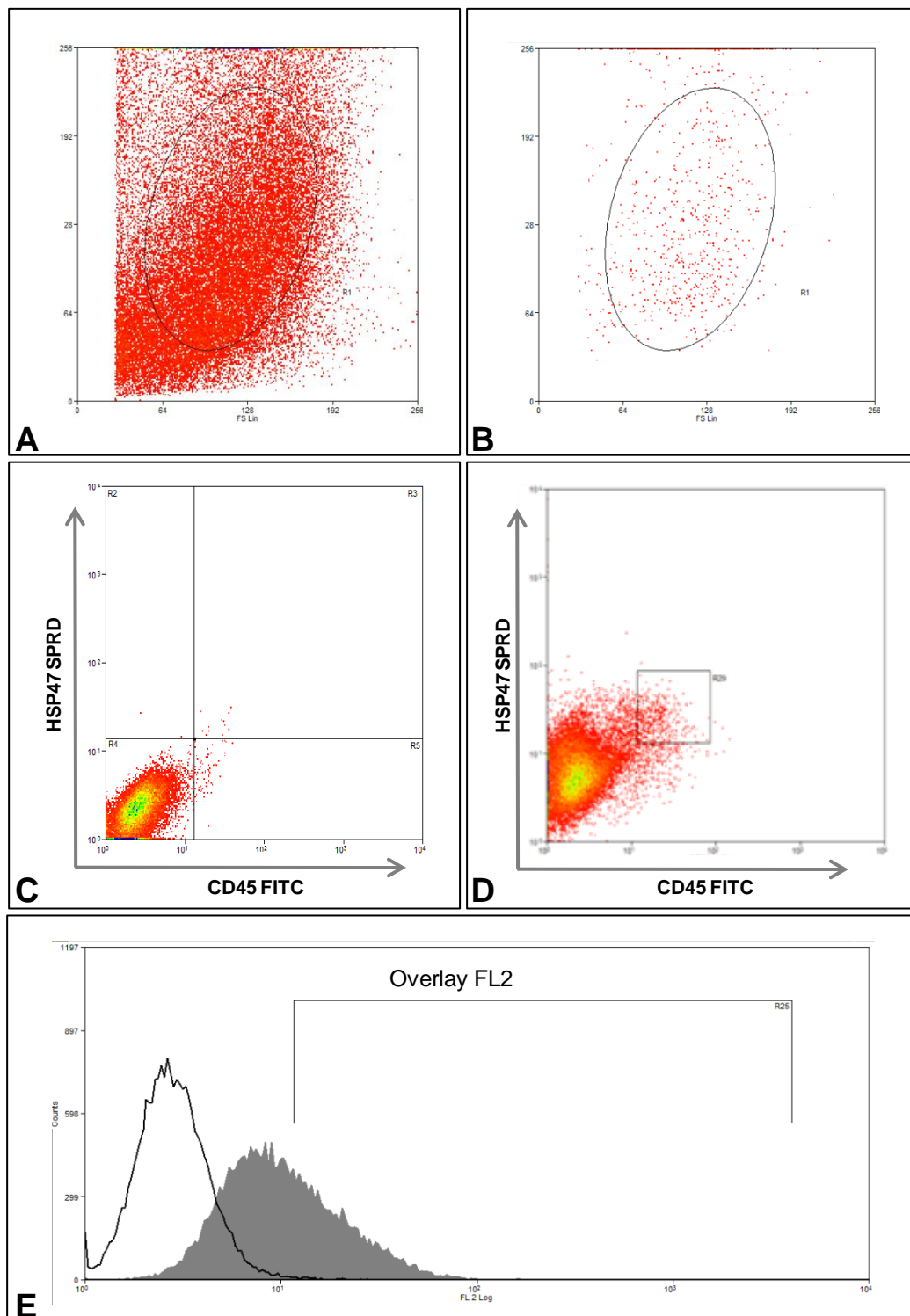
Quando verificamos o percentual de fibrócitos produtores das citocinas (IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ) observamos baixos percentuais de fibrócitos produtores destas citocinas em camundongos WT C57BL/6 sem inoculo, IL-4 (5%), IL-10 (6,6%) e TGF- $\beta$  (11%), não havendo alterações significativas na produção destas citocinas após o inóculo com PBS (Fig 8A). Entretanto, após o primeiro dia de infecção, um alto percentual de fibrócitos foi capaz de produzir IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  nos dois animais analisados. Nos animais WT C57BL/6 observamos 41% de fibrócitos produtores de IL-4, 59% de fibrócitos produtores de IL-10 e 67% de fibrócitos produtores de TGF- $\beta$ . Neste mesmo período, em animais KO TLR-2 observamos 75% de fibrócitos produtores de IL-4, 72% de fibrócitos produtores de IL-10 e 65% de fibrócitos produtores TGF- $\beta$ . Realizando uma comparação entre os grupos de animais, observamos que os KO TLR-2 apresentaram uma diferença significativa no percentual de fibrócitos produtores de IL-4 (Fig 8B). Após 7 dias de infecção observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos produzindo estas citocinas em ambos os animais analisados, onde encontramos 21% de fibrócitos produtores de IL-4, 21% de fibrócitos produtores de IL-10, 20% de fibrócitos produtores de TGF- $\beta$  em WT C57BL/6 e 27% de fibrócitos produtores de IL-4, 26% de fibrócitos produtores de IL-10, 23% de fibrócitos produtores de TGF- $\beta$  em animais KO TLR-2 (Fig 8C). Após 15 dias observamos uma redução do percentual de fibrócitos produzindo IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  nos animais KO TLR-2, correspondendo a 14% para IL-4, 12% para IL-10 e 13% para TGF- $\beta$ . Este resultado foi diferente do encontrado em animais WT C57BL/6 que mantiveram os valores de IL-10 (21%) e TGF- $\beta$  (20%) com aumento apenas no percentual de fibrócitos produzindo IL-4 (25%), contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Fig 8D).

Ao analisarmos a produção das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em animais não inoculados observamos um baixo percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (13%) e TNF- $\alpha$  (8%) e 35% dos fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  e o inóculo com PBS não alterou de forma significativa estes percentuais (Fig 9A). Contudo, após 1 dia de infecção nos animais WT C57BL/6 observamos um aumento no percentual de fibrócitos produtores destas citocinas sendo 57% para IL-12 e 56% para TNF- $\alpha$  e 67% para IFN- $\gamma$ . Este aumento também foi observado em animais KO TLR-2 onde

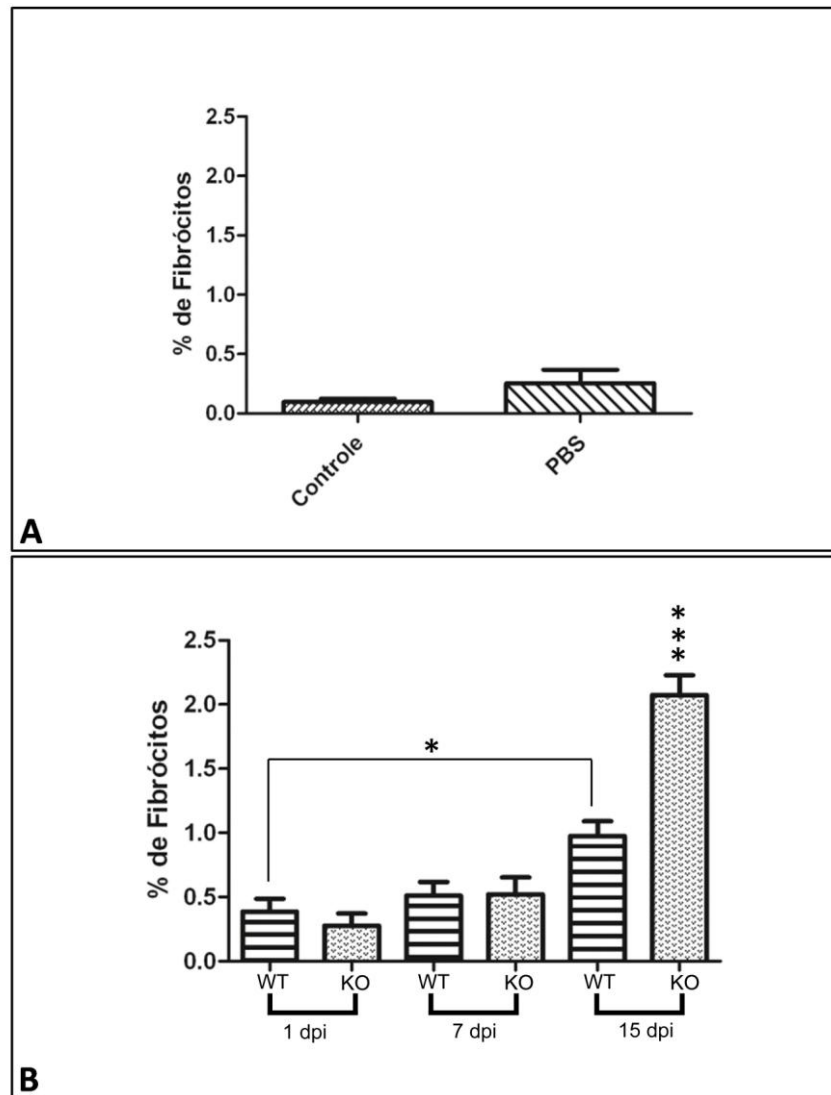
68% dos fibrócitos produziam IL-12, 73% dos fibrócitos produziam TNF- $\alpha$  e 74% dos fibrócitos produziam IFN- $\gamma$  (Fig 9B). No tempo de 7 dias observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos produzindo IL-12 e TNF- $\alpha$  em ambos os animais analisados, onde encontramos 21% de fibrócitos produtores de IL-12, 19% de fibrócitos produtores de TNF- $\alpha$  em animais WT C57BL/6 e 23% de fibrócitos produtores de IL-12, 20% de fibrócitos produtores de TNF- $\alpha$  em animais KO TLR-2. Contudo esta diminuição não é observada para a citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ , produzida em 70% e 60% dos fibrócitos no animal WT C57BL/6 e KO TLR-2 respectivamente (Fig 9C). Após 15 dias de infecção observamos um discreto aumento no percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (23%) e TNF- $\alpha$  (21%) e uma redução no percentual de fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  (60%) no animal WT C57BL/6. Diferente do que observamos em animais KO TLR-2 que teve redução no percentual de fibrócitos produzindo as três citocinas analisadas, IL-12 (16%) e TNF- $\alpha$  (15%) e IFN- $\gamma$  (37%) (Fig 9D).

De uma forma geral, nossos dados revelaram que há um aumento no percentual de fibrócitos durante a infecção sendo expressivo após o 15° dia em ambos os animais analisados e que estes produzem um misto de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e TGF- $\beta$ ), pro-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-12) e regulatórias (IL-10 e TNF- $\alpha$ ) nas primeiras 24 horas de infecção e uma produção estatisticamente maior de IFN- $\gamma$  comparada às demais citocinas a partir da primeira semana de infecção. Embora tenhamos observado diferenças estatísticas no percentual de fibrócitos presentes no sítio de infecção dos animais WT C57BL/6 e KO TLR-2, ao analisarmos a produção de citocinas esta diferença ocorreu somente na produção de IL-4 nas primeiras 24 horas após o inoculo.

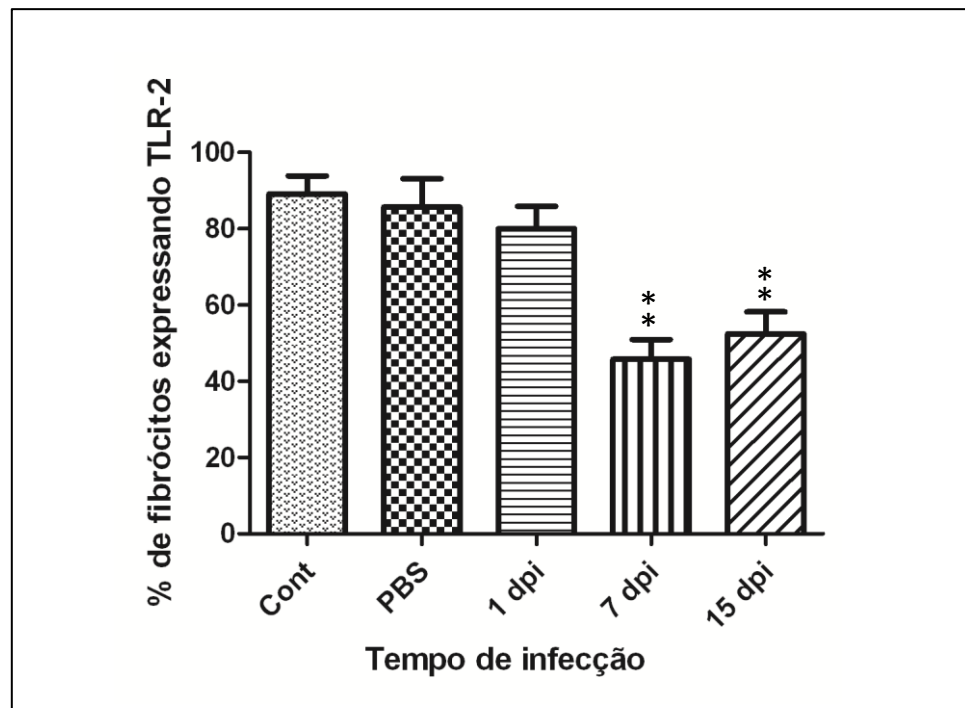




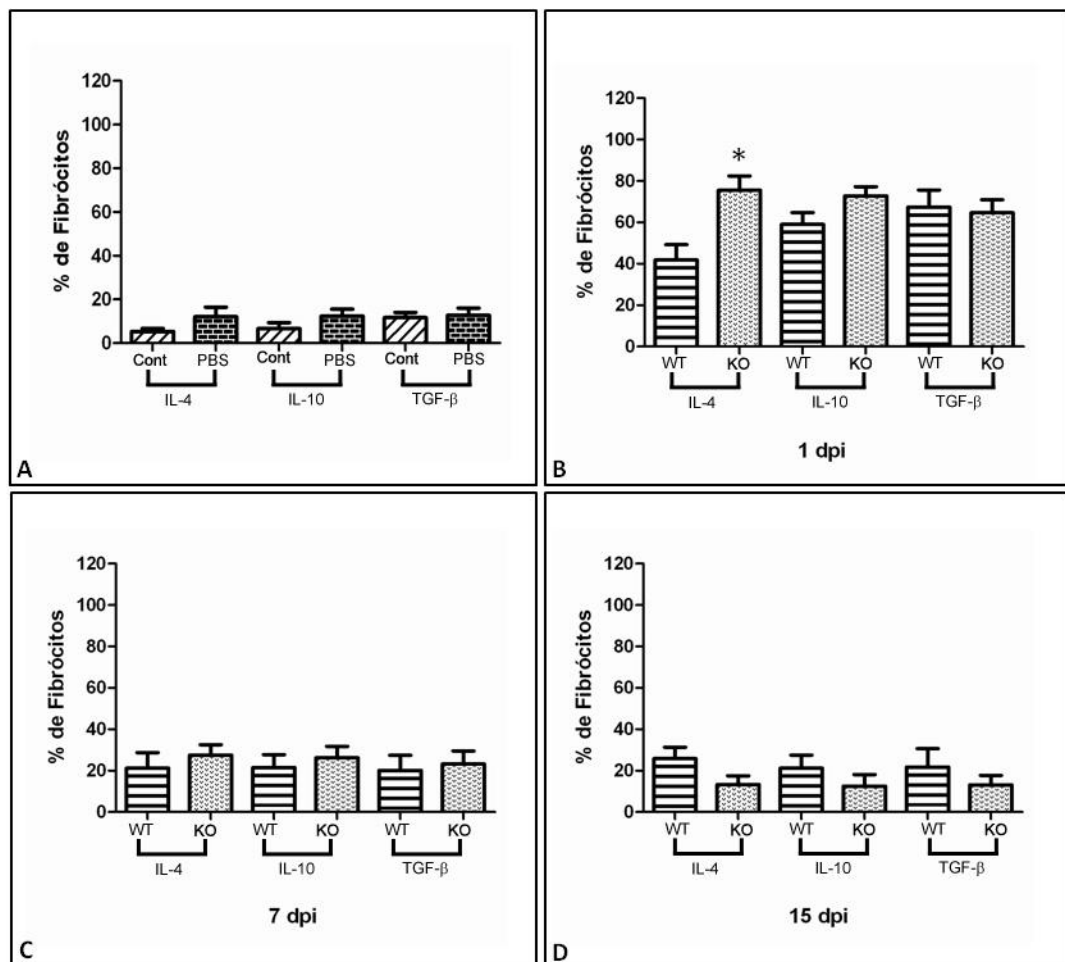
**Figura 5 (A-B): Identificação dos fibrócitos na população total de células da região auricular. A:** Dot plot (FSC e SSC) mostrando a população total obtida a partir de dissociações da região auricular. **B:** Retrogate da população duplo positiva CD45/ HSP-47. **C:** Dot plot dos controles negativos FL1 e FL3. **D:** Dot plot da população duplo positiva para CD45/ HSP-47. **E:** Histograma mostrando overlay dos controles negativo (gráfico aberto) e positivo (gráfico fechado) para FL2.



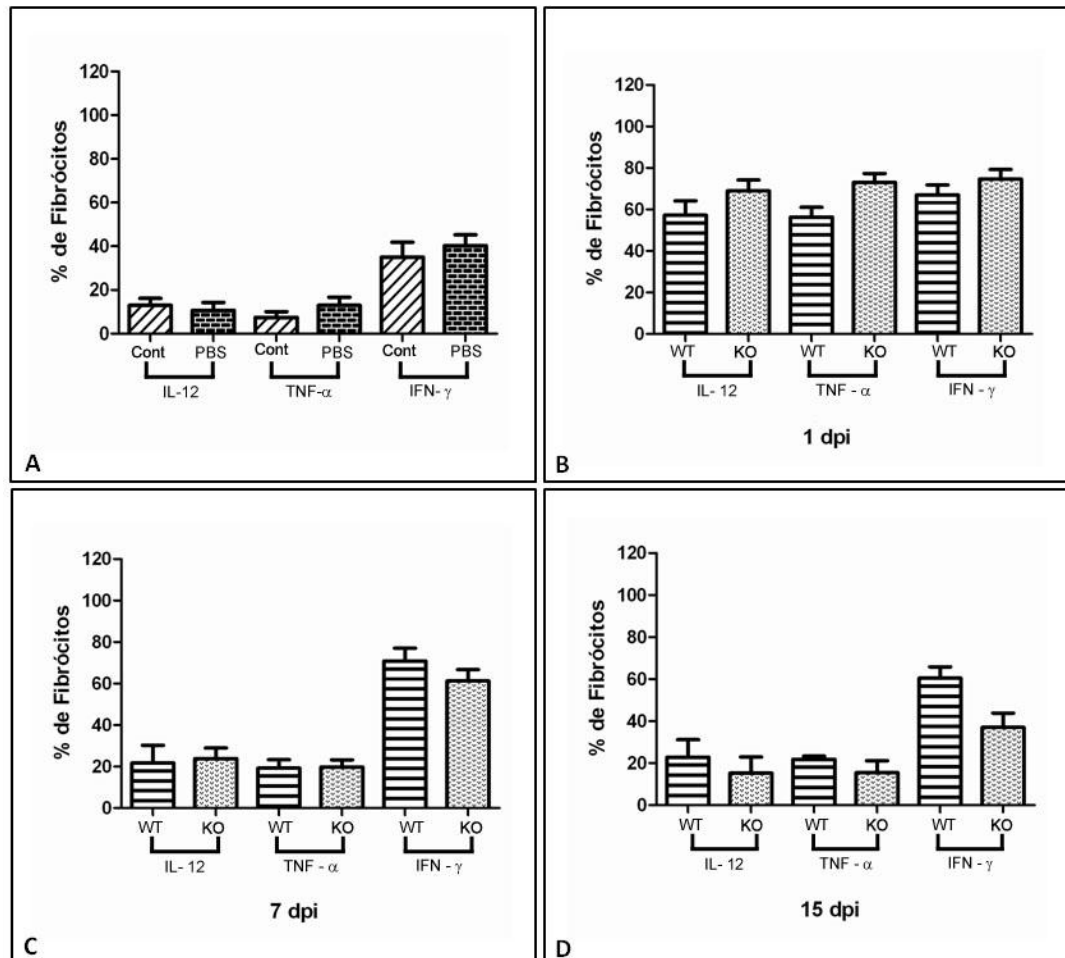
**Figura 6 (A-B): Avaliação do percentual de fibrócitos na região auricular por citometria de fluxo. A:** Percentual de fibrócitos na região auricular dos camundongos WT C57BL/6 sem inóculo e inculados com PBS (Teste t-student não pareado \* $P < 0,05$ ). **B:** Percentual de fibrócitos no sítio de infecção de camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2 inoculados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 1, 7 e 15 dias de infecção. Teste de Kruskal-Wallis \*  $p < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.



**Figura 7: Análise do percentual de fibrócitos expressando TLR-2 no sítio de lesão por citometria de fluxo.** Percentual de fibrócitos presentes na região auricular apresentando marcação positiva para TLR-2 nos camundongos C57BL/6 controle, inoculados com PBS e após 1, 7 e 15 dias de infecção. Teste de Kruskal-Wallis \* $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.



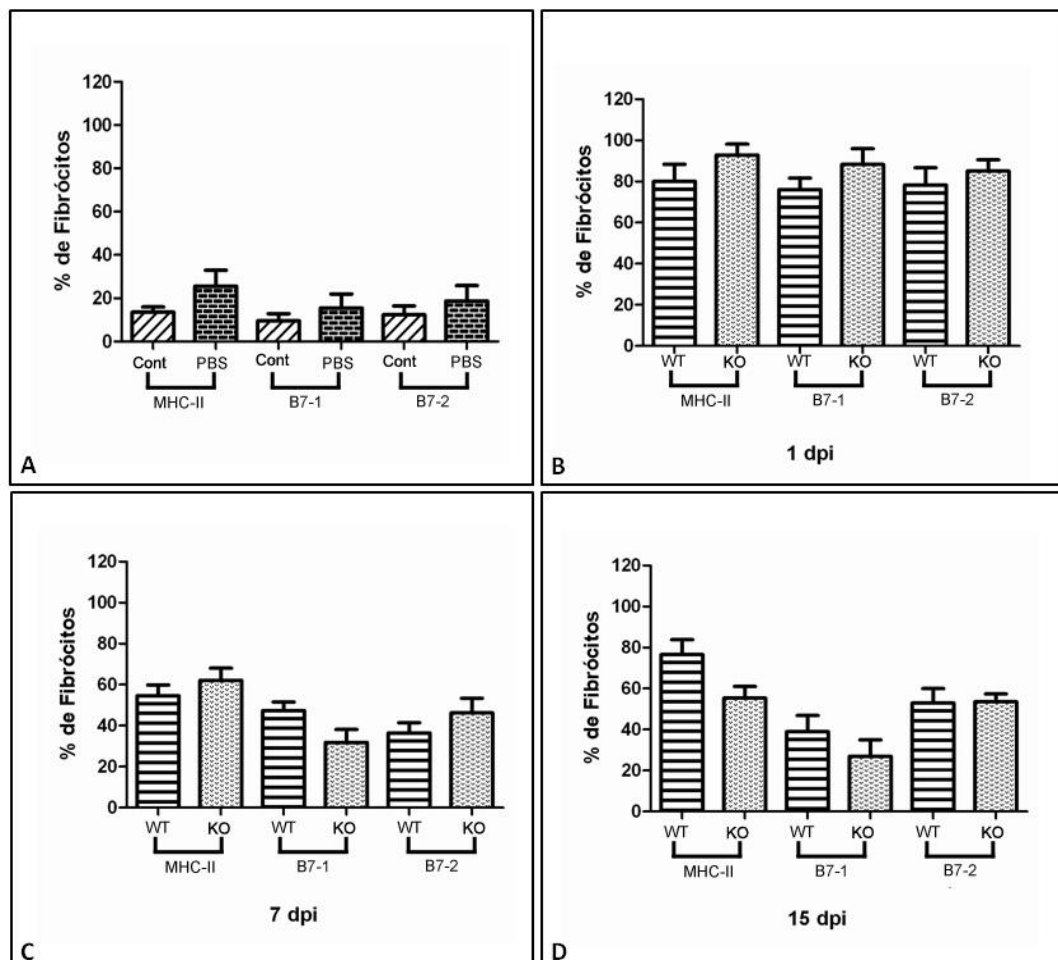
**Figura 8 (A-D): Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  no sítio de lesão.** As células foram isoladas do sítio de infecção e analisadas por citometria de fluxo quanto à marcação intracelular das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as citocinas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS **(A)**; animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia **(B)**, 7 dias **(C)** e 15 dias **(D)**. Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.



**Figura 9: (A-D): Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no sítio de lesão.** As células foram isoladas do sítio de infecção e analisadas por citometria de fluxo quanto à marcação intracelular das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as citocinas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS (A); animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia (B), 7 dias (C) e 15 dias (D). Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.

### 3.4 Análise da apresentação antigênica de fibrócitos no sítio de lesão em camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Para avaliar a participação dos fibrócitos na apresentação antigênica no sítio de lesão analisamos a expressão de MHC-II e das moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 durante a infecção. Em animais WT C57BL/6 não inoculados um baixo percentual de fibrócitos expressavam MHC-II (17%), B7-1 (15%) e B7-2 (17%) não parecendo que estes expressam constitutivamente estas moléculas. Quando analisamos animais inoculados com PBS observamos não haver diferenças significativas entre estes animais e os animais WT C57BL/6 não inoculados (Fig 10A). Após 1 dia de infecção observamos um aumento expressivo no número de fibrócitos expressando estas moléculas nas duas linhagens analisadas. Animais WT C57BL/6 apresentavam 80% de fibrócitos expressando MHC-II, 76% de fibrócitos expressando B7-1 e 78% de fibrócitos expressando B7-2. Uma pequena diferença foi observada em animais KO TLR-2 onde 92% dos fibrócitos expressavam MHC-II, 88% de fibrócitos expressando B7-1 e 85% de fibrócitos expressando B7-2 (Fig 10B). Na segunda semana de infecção ocorreu uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando estas moléculas, onde observamos em animais WT C57BL/6 54% de fibrócitos MHC-II positivos, 47% de fibrócitos B7-1 positivos e 36% de fibrócitos B7-2 positivos. Pequenas diferenças foram observadas em animais KO TLR-2 onde encontramos 62% de fibrócitos MHC-II positivos, 31% de fibrócitos B7-1 positivos e 46% de fibrócitos B7-2 positivos (Fig 10C). Após 15 dias de infecção em animais WT observamos aumento no percentual de fibrócitos expressando MHC-II (76%) e B7-2 (52%) e diminuição no percentual de fibrócitos expressando B7-1 (38%). Em animais KO TLR-2 observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando MHC-II (55%) e B7-1 (22%), contudo o percentual de fibrócitos expressando B7-2 teve um leve aumento para 53% (Fig 10D). Esses dados mostram que após a infecção cerca de 90% dos fibrócitos passaram a expressar as moléculas requeridas para apresentação antigênica como MHC-II, B7-1 e B7-2, contudo esta expressão foi reduzida a partir da primeira semana de infecção, não havendo diferenças estatísticas nos valores encontrados nos camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2.



**Figura 10 (A-D): Análise do percentual de fibrócitos expressando MHC-II, B7-1 e B7-2 no sítio de lesão.** As células foram isoladas do sítio de infecção e analisadas por citometria de fluxo quanto à marcação das moléculas MHC-II, B7-1 e B7-2. Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as moléculas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS **(A)**; animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia **(B)**, 7 dias **(C)** e 15 dias **(D)**. Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.

### 3.5 Estudo da resposta celular de fibrócitos no linfonodo drenante de camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

A identificação dos fibrócitos no linfonodo drenante foi realizada através da dupla marcação de CD45 e HSP-47 em ensaios de citometria de fluxo seguindo as mesmas etapas da análise realizada para o sítio de lesão: Identificação da população celular duplo positiva para CD45/HSP-47 no dot plot (Fig 11C), retrogate da população duplo positiva no dot plot (Fig 11B) e demarcação da região celular para análise no dot plot do total de células (Fig 11A). As amostras foram analisadas utilizando a região demarcada como duplo positiva dentro do histograma das diferentes marcações reveladas com PE (FL2).

Para avaliar a resposta celular do fibrócito no linfonodo drenante, quantificamos o percentual de fibrócitos e a produção das citocinas IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Ao analisarmos o percentual de fibrócitos no linfonodo drenante de animais WT C57BL/6 não inoculados observamos que os fibrócitos encontram-se no linfonodo correspondendo a 27% das células e que o inóculo com PBS não altera significativamente este percentual (29%) (Fig 12A). Contudo, após infecção com *L. (L.) amazonensis* observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos tanto em animais WT C57BL/6 quanto em animais KO TLR-2. O percentual de fibrócitos sofreu redução para 15% no tempo de 1 dia, 9% no tempo de 7 dias e 14% no tempo de 15 dias em animais WT C57BL/6 (Fig 12B) e reduziu para 20% no tempo de 1 dia, 5% no tempo de 7 dias e 9% no tempo de 15 dias após infecção em animais KO TLR-2 (Fig 12B).

Ao analisarmos a capacidade dos fibrócitos presentes no linfonodo em produzir as citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  observamos que nos animais não inoculados menos de 3% de fibrócitos eram produtores destas citocinas, não havendo diferenças entre os animais não inoculados e inoculados com PBS (Fig 13A). Após 1 dia de infecção observamos um aumento expressivo no número de fibrócitos produzindo IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  em ambos os animais utilizados, onde 26% produziam IL-4, 22% produziam IL-10 e 10% produziam TGF- $\beta$  em animais WT C57BL/6 e 10% produziam IL-4, 7% produziam IL-10 e 9% produziam TGF- $\beta$  em animais KO TLR-2 (Fig 13B). Esses dados mostram não só um aumento no

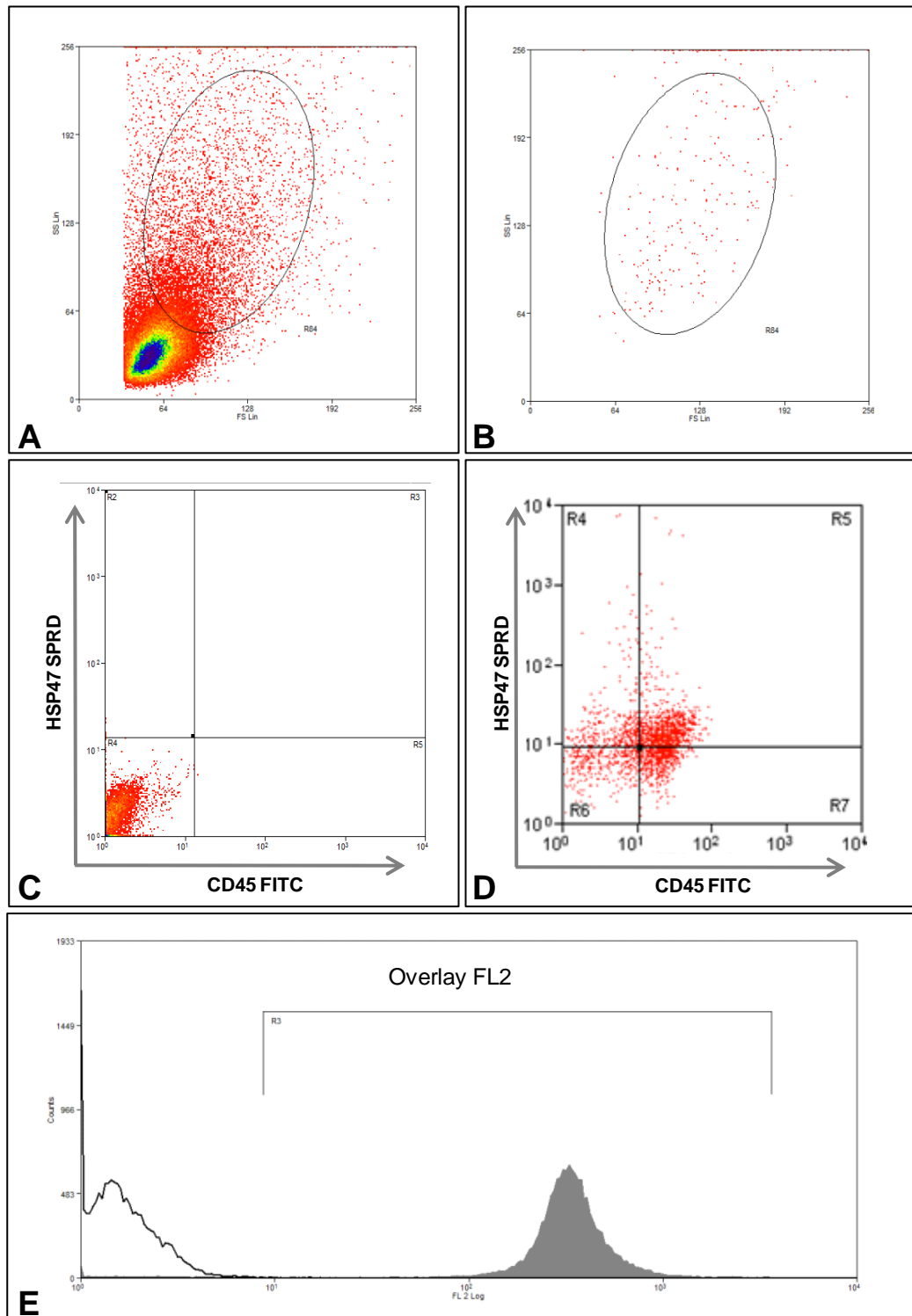


percentual de fibrócitos produzindo estas citocinas quando comparadas aos animais não inoculados como também diferenças na produção de IL-4 e IL-10 entre os animais WT C7BL/6 e KO TLR-2 inoculados com *L. (L.) amazonensis*. Após a primeira semana de infecção observamos uma redução no percentual de fibrócitos produzindo IL-4 (12%), IL-10 (15%) e TGF- $\beta$  (8%) em animais WT C57BL/6 e um discreto aumento no percentual de fibrócitos produzindo IL-4 (11%), IL-10 (12%) e TGF- $\beta$  (10%) em animais KO TLR-2, contudo neste tempo não encontramos diferenças estatísticas entre os dois animais analisados (Fig 13C). Duas semanas após a infecção observamos uma diminuição do percentual de fibrócitos produzindo as citocinas IL-4 (4%), IL-10 (6%) e TGF- $\beta$  (5%) em animais WT C57BL/6, contudo, neste mesmo tempo em animais KO TLR-2 observamos a diminuição do percentual de fibrócitos produzindo IL-10 (6%) e TGF- $\beta$  (5%) e o aumento no percentual de fibrócitos produzindo IL-4 (15%) com diferença estatística entre os animais analisados (Fig 13D).

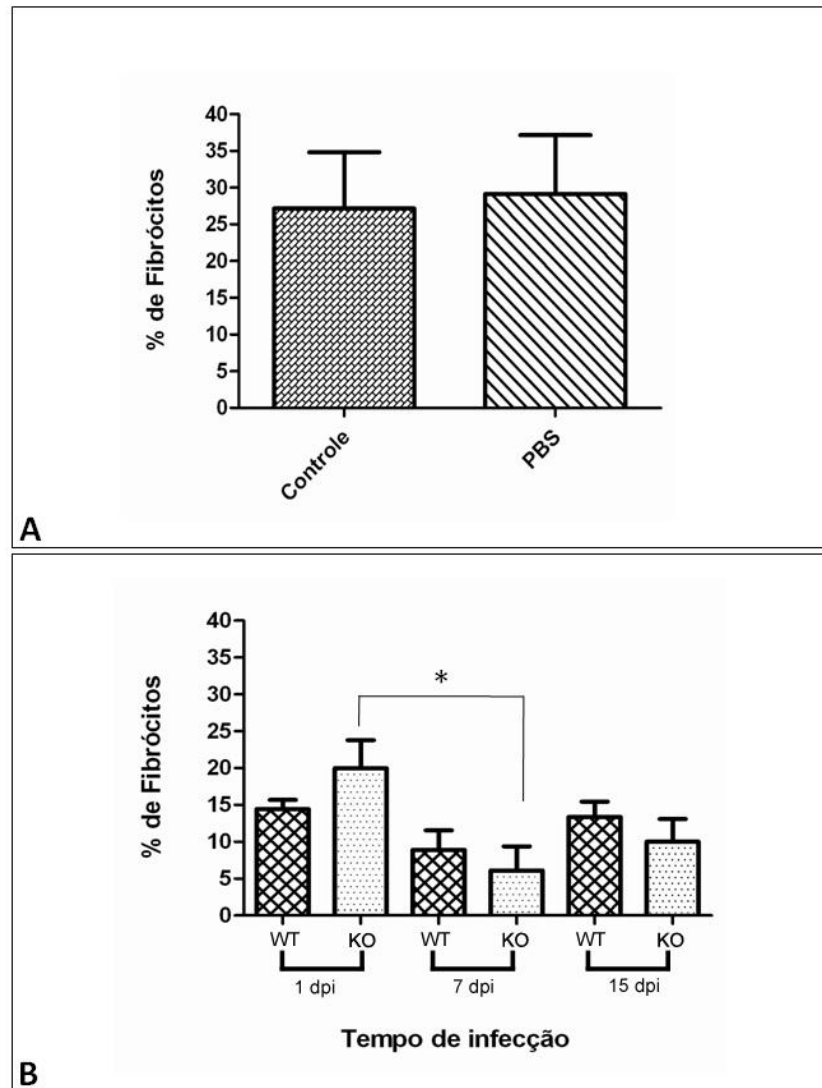
Quando as citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram analisadas em animais não inoculados observamos que menos de 3% dos fibrócitos produziam IL-12 e TNF- $\alpha$  e 8% dos fibrócitos produziam IFN- $\gamma$ , não havendo diferenças estatísticas entre os animais não inoculados e animais inoculados com PBS (Fig 14A). Após 1 dia de infecção observamos um pequeno aumento no percentual de fibrócitos produtores de IL-12 (8%), TNF- $\alpha$  (7%) e um aumento expressivo no percentual de fibrócitos produtores de IFN- $\gamma$  (44%) em animais WT C57BL/6. Comparando estes animais com os animais KO TLR-2 não encontramos diferença no percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (7%), contudo diferenças estatisticamente significativas foram encontradas comparando o percentual de fibrócitos produzindo TNF- $\alpha$  (26%) e IFN- $\gamma$  (20%) (Fig 14B). Após 7 dias de infecção, observamos um pequeno aumento no percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (12%), TNF- $\alpha$  (9%) e IFN- $\gamma$  (48%) em animais WT C57BL/6, não havendo diferenças estatísticas quando comparados aos animais KO TLR-2 que apresentaram um aumento na produção de IL-12 (9%), TNF- $\alpha$  (20%) e IFN- $\gamma$  (30%) (Fig 14C). Após 15 dias de infecção, animais WT C57BL/6 apresentaram uma leve diminuição do percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (7%), TNF- $\alpha$  (6%) e uma drástica redução no percentual de fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  (28%). Nos animais KO TLR-2 também observamos uma leve diminuição no percentual de fibrócitos produzindo IL-12 (6%), e TNF- $\alpha$  (12%), contudo, para a

citocina IFN- $\gamma$  observamos um aumento expressivo no percentual de fibrócitos produtores sendo este estatisticamente significativo quando comparado ao percentual encontrado nos animais WT C57BL/6 (Fig 14D).

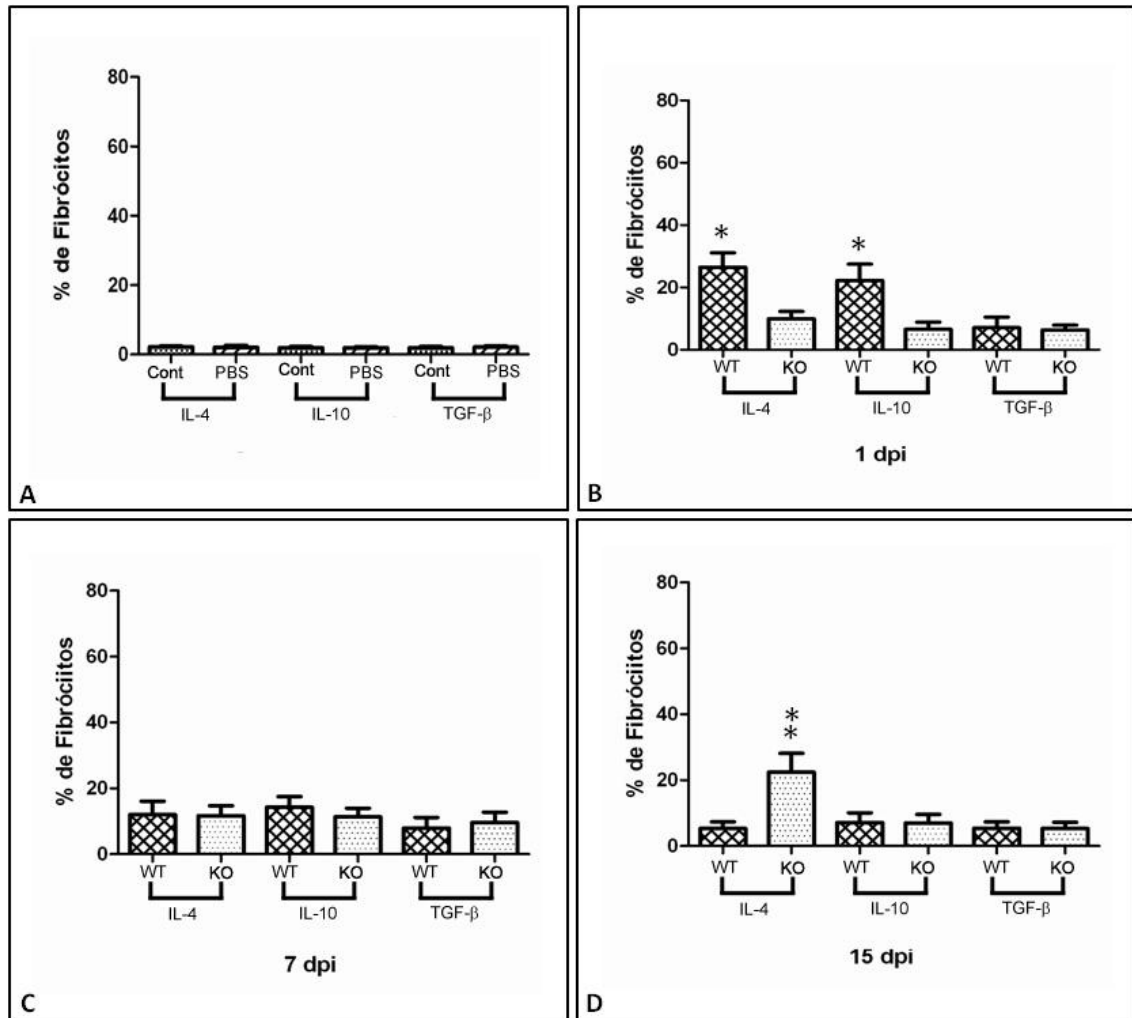
Em conjunto, estes dados nos revelaram que os fibrócitos encontram-se nos linfonodos drenantes de animais não inoculados com muito baixa produção de citocinas e após a infecção com *L. (L.) amazonensis* o número de fibrócitos presentes no linfonodo diminuiu e a produção de citocinas aumentou. No linfonodo diferenças são observadas no perfil de citocinas produzidas quando comparamos animais WT C57BL/6 e KO TLR-2. Em camundongos WT C57BL/6 1 dia após a infecção fibrócitos produzem as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , já em animais KO TLR-2, os fibrócitos produzem TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Após a primeira semana de infecção fibrócitos de animais WT diminuem a produção de IL-4 e IL-10, mas mantêm a produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que em animais KO TLR-2 fibrócitos mantêm a produção de IFN- $\gamma$ , diminuem a produção de TNF- $\alpha$  e aumentam a produção de IL-4.



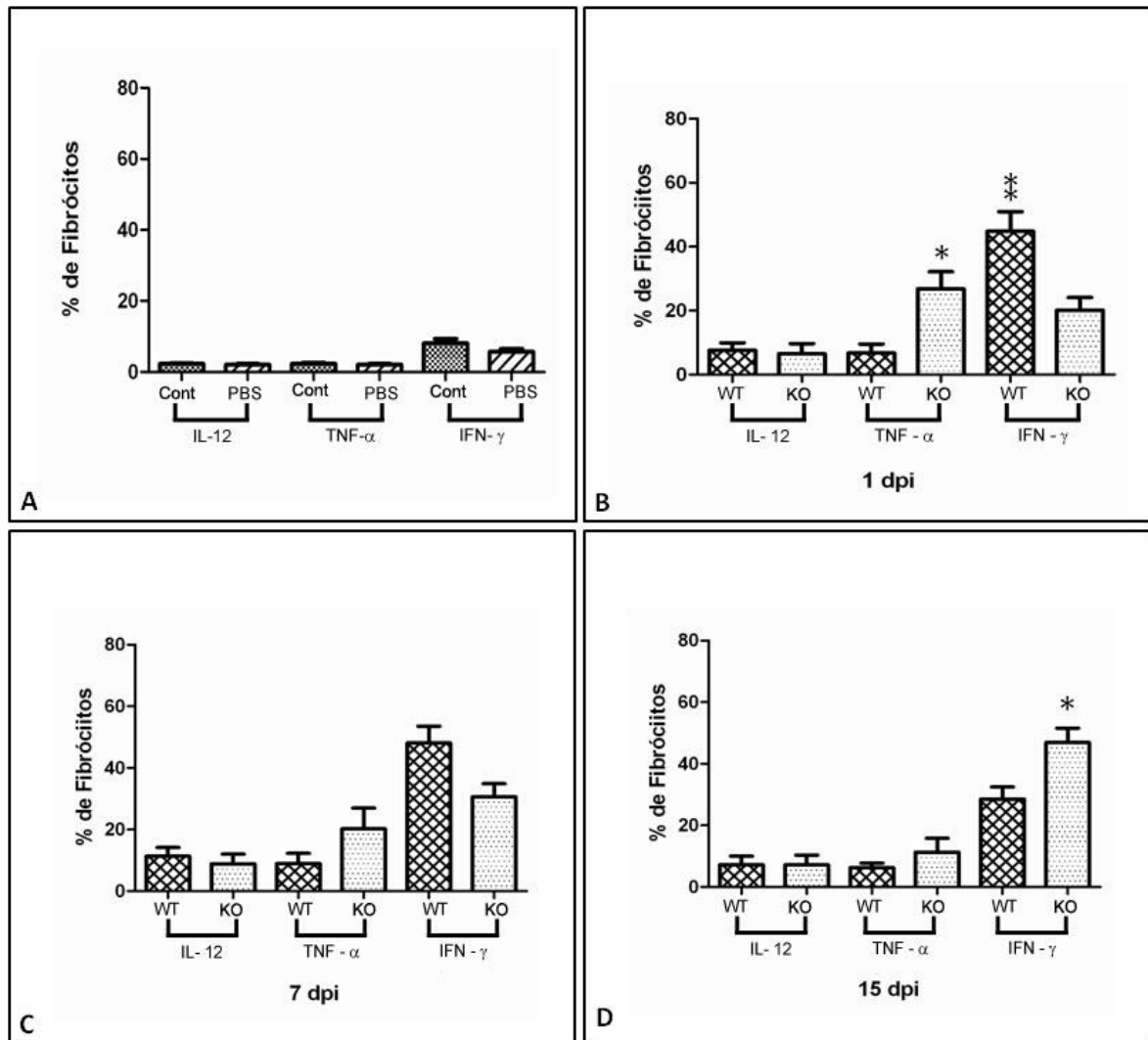
**Figura 11 (A-E): Identificação dos fibrócitos na população total de células do linfonodo drenante. A:** Dot plot (FSC e SSC) mostrando a população total obtida a partir de dissociações do linfonodo drenante. **B:** Retrogate da população duplo positiva CD45/ HSP-47. **C:** Dot plot dos controles negativos FL1 e FL3. **D:** Dot plot da população duplo positiva para CD45/ HSP-47. **E:** Histograma mostrando overlay dos controles negativo (gráfico aberto) e positivo (gráfico fechado) para FL2.



**Figura 12 (A-C): Avaliação do percentual de fibrócitos no linfonodo drenante por citometria de fluxo. A:** Percentual de fibrócitos no linfonodo drenante dos camundongos C57BL/6 sem inóculo e inculados com PBS (Teste t-student não pareado  $*P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.). **B:** Percentual de fibrócitos no linfonodo drenante de camundongos C57BL/6 e KO TLR-2 inoculados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 1, 7 e 15 dias de infecção. Teste de Kruskal-Wallis  $* p < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.



**Figura 13: (A-D): Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-4, IL-10 e TGF-β no linfonodo drenante.** As células foram isoladas do linfonodo drenante e analisadas por citometria de fluxo quanto à marcação intracelular das citocinas IL-4, IL-10 e TGF-β. Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as citocinas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS (**A**) e animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia (**B**), 7 dias (**C**) e 15 dias (**D**). Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.

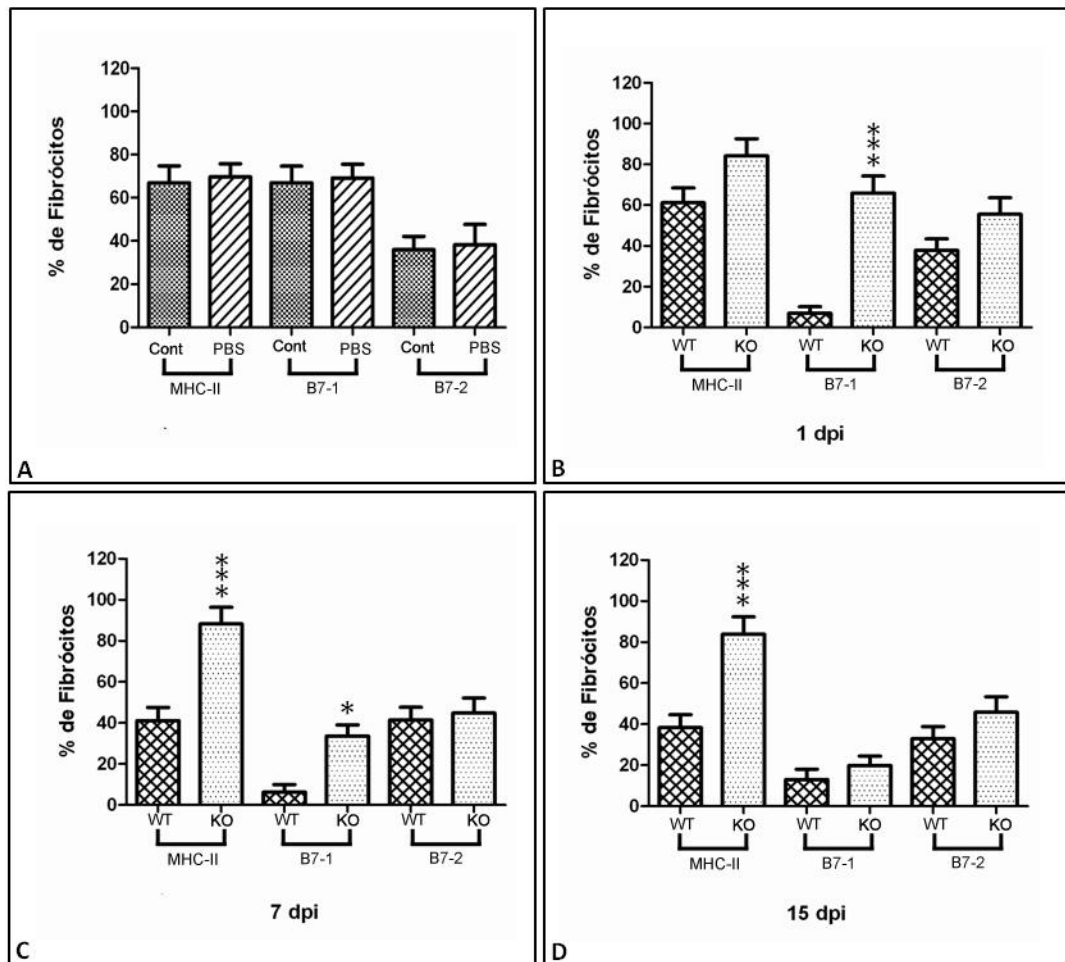


**Figura 14: (A-D): Análise do percentual de fibrócitos produtores das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no linfonodo drenante.** As células foram isoladas do linfonodo drenante e analisadas por citometria de fluxo quanto a marcação intracelular das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as citocinas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS **(A)** e animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia **(B)**, 7 dias **(C)** e 15 dias **(D)**. Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.

### 3.6 Análise da apresentação antigênica de fibrócitos no linfonodo drenante de camundongos infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Na análise da expressão das moléculas requeridas para apresentação antigênica observamos que em animais WT C57BL/6 não inoculados 67% de fibrócitos expressavam MHC-II, 68% de fibrócitos expressavam B7-1 e 38% de fibrócitos expressando B7-2 (Fig 15A). Com 1 dia após infecção observamos um aumento no percentual de fibrócitos expressando MHC-II (80%), B7-1(62%) e B7-2 (59%) em animais KO TLR-2 e uma diminuição do percentual de fibrócitos expressando MHC-II (60%), B7-1 (10%) e B7-2 (40%) em animais WT C57BL/6 demonstrando diferença estatística na expressão de B7-1 entre os animais neste tempo de infecção (Fig 15B). Após 7 dias observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando de MHC-II (41%), B7-1 (7%) e B7-2 (39%) em animais WT C57BL/6, diferente do observado em animais KO TLR-2 que apresentaram uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando de B7-1 (33%) e B7-2 (45%) e um aumento no percentual de fibrócitos expressão de MHC-II (88%). Neste tempo de infecção, diferenças estatísticas na expressão das moléculas MHC-II e B7-1 são observadas quando comparamos os animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 (Fig 15C). Após 15 dias de infecção observamos uma leve diminuição no percentual de fibrócitos expressando de MHC-II (38%) e B7-2 (33%) e um aumento no percentual de fibrócitos expressando B7-1 em animais WT C57BL/6, enquanto que em animais KO TLR-2 observamos uma diminuição no percentual de fibrócitos expressando MHC-II (83%), B7-1 (19%) e um aumento no percentual de fibrócitos expressando B7-2 (47%) (Fig 15D).

Fibrócitos de animais WT C57BL/6 expressavam MHC-II, B7-1 e B7-2 constitutivamente e apresentaram uma expressiva redução na expressão de MHC-II e B7-1 a partir de 1 dia de infecção. Contudo, isto não foi observado nos animais KO TLR-2.



**Figura 15 (A-D): Análise do percentual de fibrócitos expressando MHC-II, B7-1 e B7-2 no linfonodo drenante.** As células foram isoladas do linfonodo drenante e analisadas por citometria de fluxo quanto à marcação das moléculas MHC-II, B7-1 e B7-2. Gráficos mostrando o percentual de fibrócitos positivos para as moléculas em animais C57BL/6 controle ou inoculados apenas com PBS (A); animais WT C57BL/6 e KO TLR-2 infectados por 1 dia (B), 7 dias (C) e 15 dias (D). Teste de Kruskal-Wallis \*  $P < 0,05$  utilizando 5 animais por tempo em três experimentos independentes.



### **3.7 Estudo *in vitro* dos fibrócitos obtidos de cultura primária do sangue periférico**

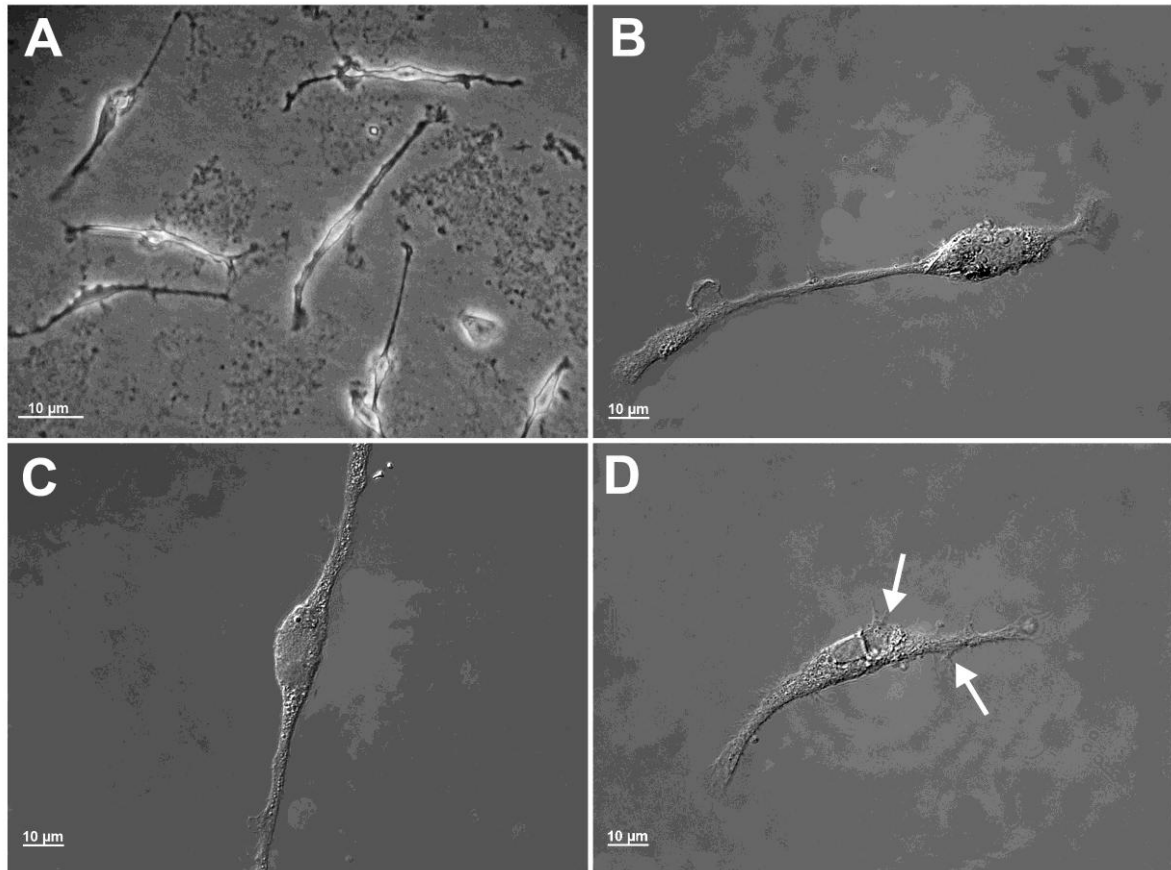
#### **3.7.1 Caracterização morfológica e fenotípica dos fibrócitos**

Os fibrócitos obtidos a partir de mononucleares do sangue periférico foram caracterizados através da análise morfológica e fenotípica utilizando as microscopias correlativas, de luz, eletrônica de transmissão e de fluorescência.

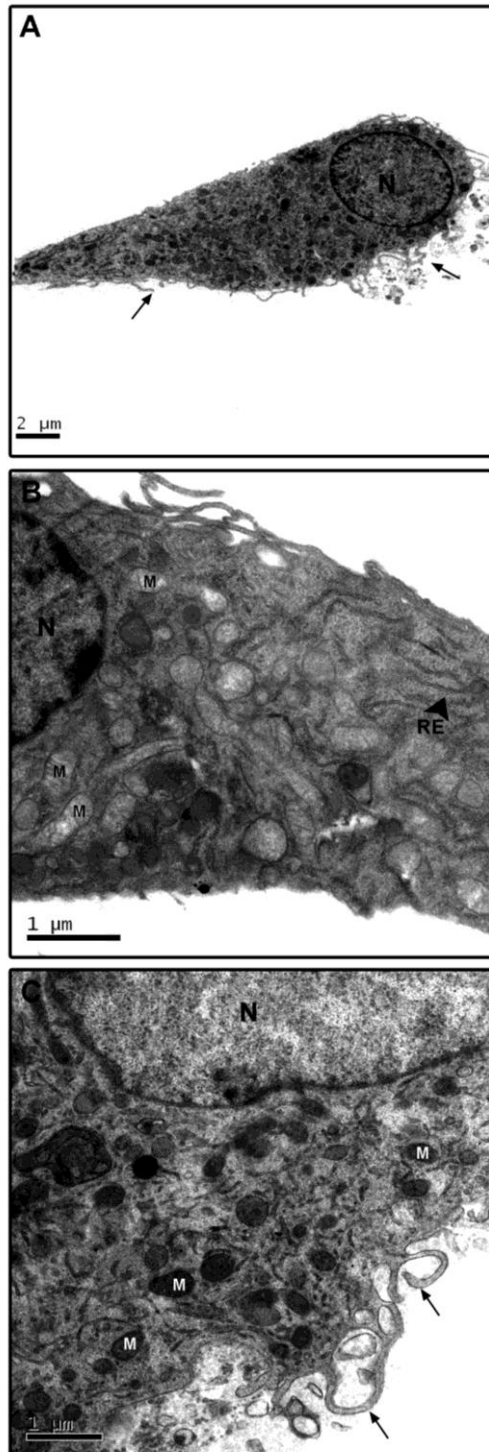
Na análise por microscopia de luz observamos que os fibrócitos obtidos de cultura primária mantidos por mais de 15 dias em cultivo, em meio sem soro, apresentam morfologia alongada e fina, não formando monocamada (Fig 16A). Por microscopia de interferência diferencial (DIC), observamos fibrócitos alongados unilateralmente (Fig 16B) e uniformemente alongados (Fig 16C), além de uma série de prolongamentos citoplasmáticos (Fig 16D).

Por microscopia eletrônica de transmissão observamos que os fibrócitos de culturas não infectadas apresentavam núcleo com cromatina periférica (Fig 17A), retículo endoplasmático rugoso distribuído em rede com perfil alongado (Fig 17B) e citoplasma rico em mitocôndrias e muitos prolongamentos citoplasmáticos (Fig 17C).

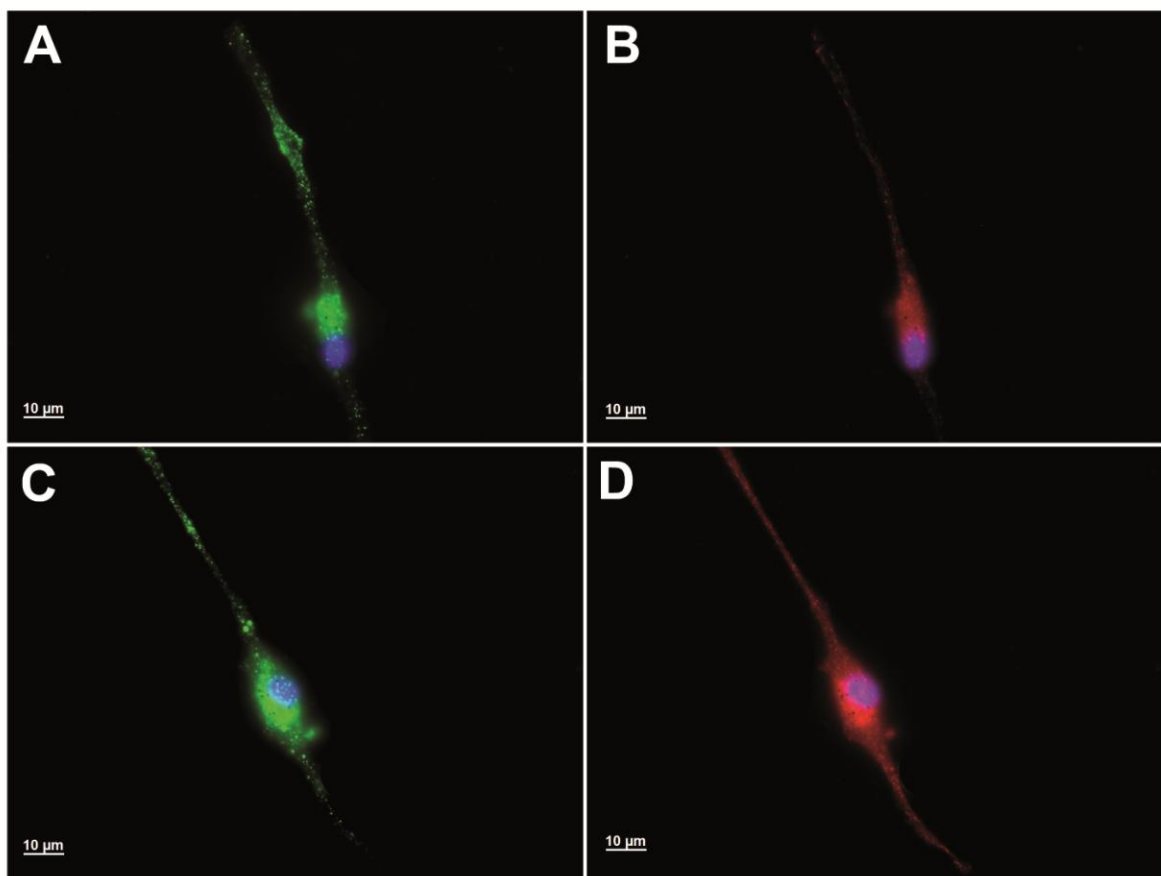
A caracterização fenotípica dos fibrócitos foi realizada por imunofluorescência através da associação dos três principais marcadores: CD34 (marcador de célula progenitora), CD45 (marcador pan-leucocitário) e HSP-47 (proteína de choque térmico envolvida na síntese de colágeno tipo I). Os fibrócitos em cultura mostraram intensa marcação em verde para CD45 (Fig 18A) e para CD34 (Fig 18C) distribuída por toda a superfície do fibrócito. A marcação em vermelho para HSP-47 (Figs 18B/18D) distribuída no citoplasma da célula, sendo mais intensa na região próxima ao núcleo.



**Figura 16 (A-D): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia de luz.** Fibrócitos de cultura primária do sangue periférico de camundongos C57BL/6. Micrografia em contraste de fase mostrando fibrócitos em cultura **(A)**. Microscopia de interferência diferencial (DIC), mostrando fibrócitos alongados unilateralmente **(B)**, uniformemente alongados **(C)** e em **(D)** fibrócitos apresentando prolongamentos citoplasmáticos (setas).



**Figura 17 (A-C): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão.** Micrografias eletrônicas de fibrócitos de cultura primária do sangue periférico de camundongos C57BL/6 mostrando: **(A)** prolongamentos citoplasmáticos (seta), núcleo com cromatina periférica (N), **(B)** retículo endoplasmático em rede com formato delgado (cabeça de seta) e **(C)** citoplasma rico em mitocôndrias (M).



**Figura 18 (A–D): Caracterização fenotípica das culturas de fibrócitos.** Fibrócitos de cultura primária do sangue periférico de camundongos C57BL/6 marcados com anti-CD45 FITC (A), anti-CD34/ alexa 488 (C), anti-HSP-47 TRITC (B/D).

### 3.7.2 Análise da infecção por formas promastigota de *Leishmania (L.) amazonensis*

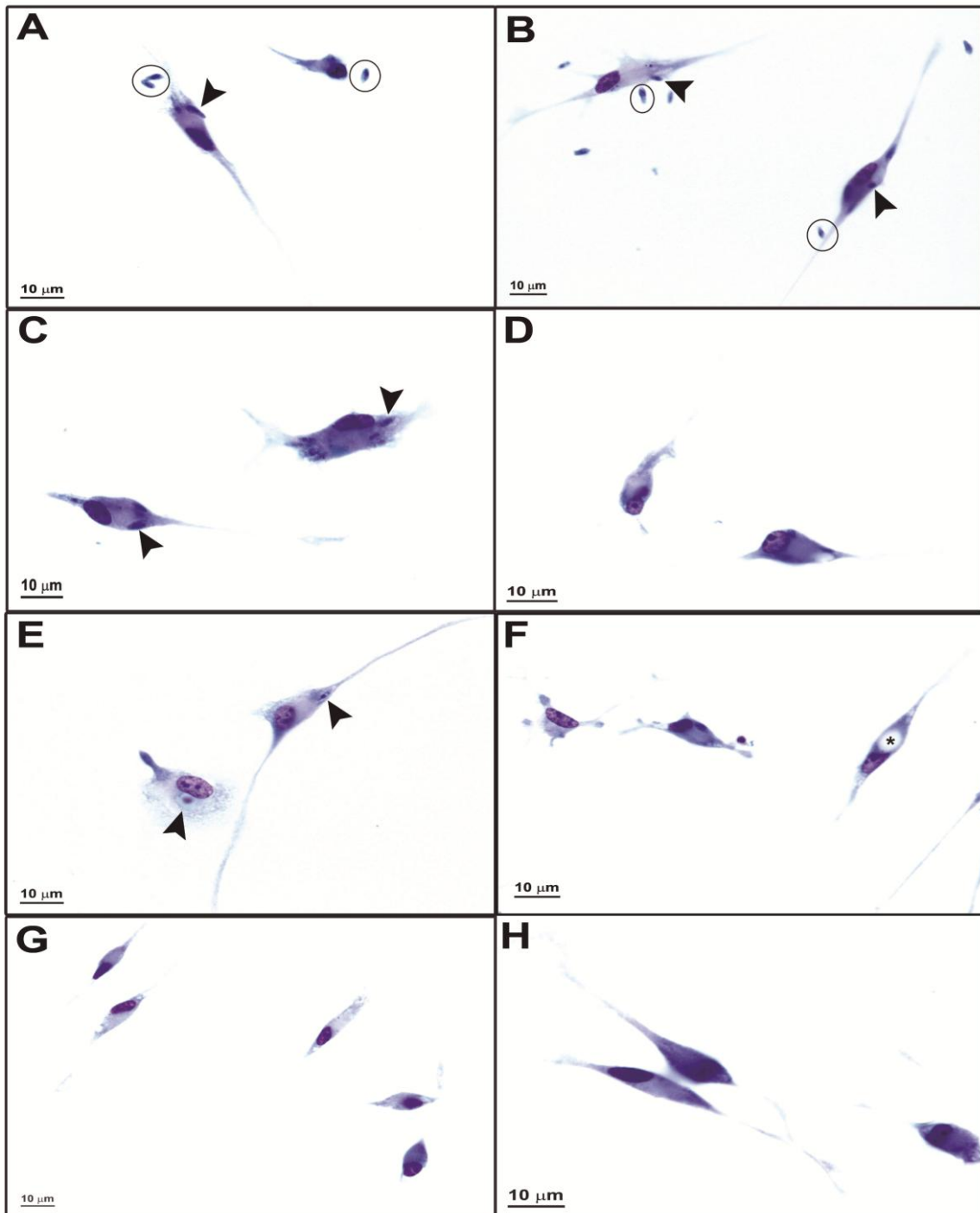
A análise da infecção das culturas primárias de fibrócitos com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostrou que estas células são capazes de endocitar os parasitos nas primeiras horas de infecção. Após 2 horas de infecção, cerca de 40% de fibrócitos apresentavam parasitos aderidos (Fig 19A) e 30% dos fibrócitos apresentavam parasitos recém-endocitados no interior de vacúolos parasitóforos estreitos (Fig 19B). A partir de 6 horas de infecção observamos uma redução para 23 o percentual de fibrócitos com parasitos aderidos e um aumento para 35 no percentual de células com parasitos internalizados (Fig 19C), além observamos células não parasitadas (Fig 19D). Após 24 horas observamos uma redução significativa na infecção, onde encontramos apenas 5% das células com parasitos em seu interior. Neste tempo de infecção a cultura apresentou grande número de fibrócitos com morfologia normal, poucas células parasitadas (Fig 19E) e células com vacúolos vazios (Fig 19F). Após este tempo de infecção não foram mais observados fibrócitos parasitados (Fig 19G) e estes apresentaram morfologia semelhante a observada em culturas não infectadas (Fig 19H). O percentual de parasitos aderidos e internalizados foi mostrado na figura 20.

Para verificar se a infecção por *L. (L.) amazonenses* levaria a modificações na morfologia do fibrócito, estes foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. A análise ultraestrutural demonstrou que os fibrócitos infectados por *L. (L.) amazonensis* não apresentaram diferenças em sua morfologia quando comparada as culturas não infectadas. Nesta cultura, os fibrócitos apresentavam núcleo com cromatina periférica com nucléolo único e retículo endoplasmático com perfil delgado (Fig 21A). Após 2 horas de infecção observamos fibrócitos com parasito no interior de vacúolo parasitóforo e o citoplasma rico em mitocôndrias (Fig 21B) além disso, observamos parasitas recém endocitados apresentando flagelo exteriorizado e cinetoplasto bem visível (Fig 21C).

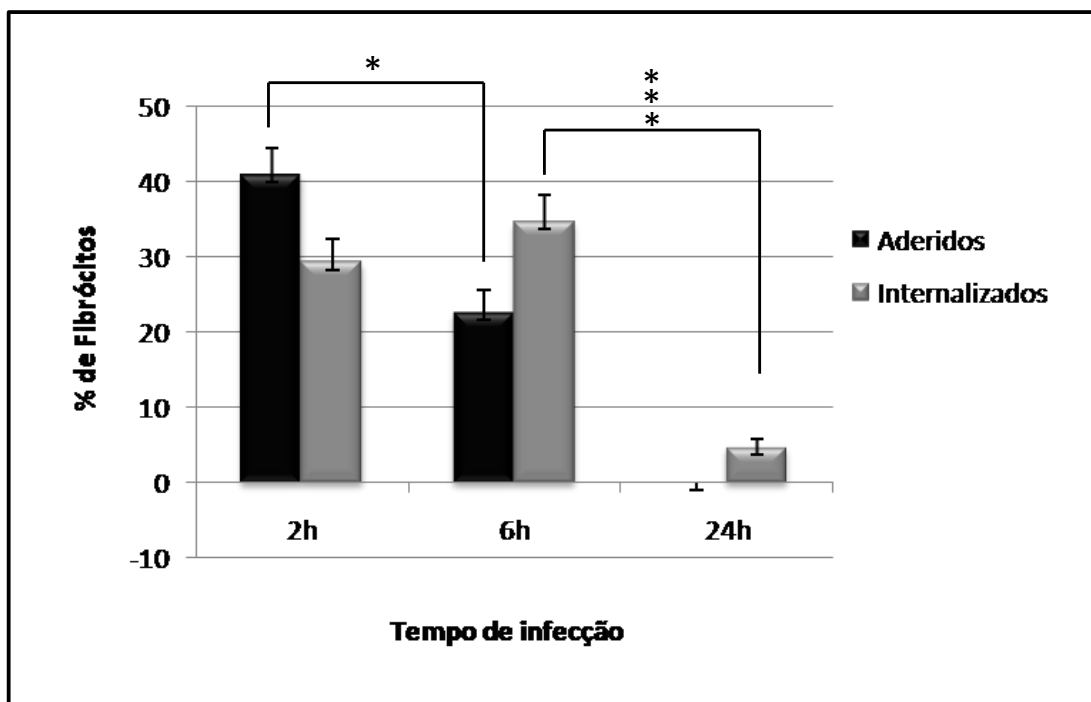
Para analisar se a infecção dos fibrócitos com *L. (L.) amazonensis* promoveria a diferenciação destas células e a perda na expressão dos marcadores fenotípicos, realizamos a marcação com anti-CD45, anti-CD34 e anti-HSP-47. Após 24 horas, células presentes nesta cultura apresentaram intensa marcação em verde para

CD45 (Fig 22A) e CD34 (Fig 22C) associados à marcação em vermelho de HSP-47 (Figs 22B/D), mostrando que estas células não sofreram alterações na expressão das moléculas fenotípicas.

Para avaliar se TLR-2 poderiam participar na endocitose do parasito, fibrócitos foram marcados para TLR-2 e analisados por microscopia eletrônica de transmissão. Fibrócitos não infectados apresentaram marcação para TLR-2 em prolongamentos citoplasmáticos (Fig 23A) e no interior de vesículas (Fig 23B). Após infecção esta marcação foi também observada em prolongamentos citoplasmáticos (Fig 23C) e no interior do endossoma inicial contendo parasito (Fig 23D).

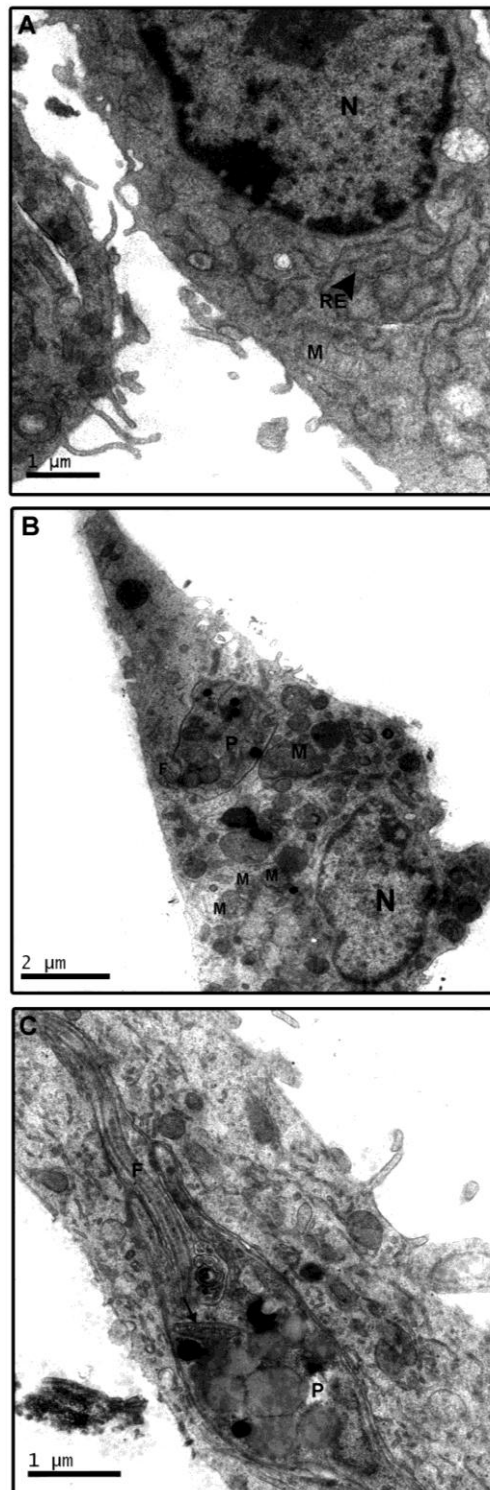


**Figura 19: Análise da infecção de fibrócitos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.** Com 2 horas de infecção **(A-B)** observamos fibrócitos contendo parasitas aderidos (círculos) e parasitas internalizados (cabeça de seta). Após 6 horas de infecção **(C-D)** observamos fibrócitos com parasita no interior de vacúolo estreito (cabeça de seta) e fibrócitos não parasitados. Após 24 horas de infecção **(E-F)** observamos fibrócitos contendo parasito internalizado (cabeça de seta) e fibrócitos apresentando vacúolo vazio (asterísco). Após 48 horas de infecção **(G)**, não observamos mais a presença de parasitos na cultura, e os fibrócitos apresentaram morfologia semelhante à encontrada em culturas não infectadas **(H)**.

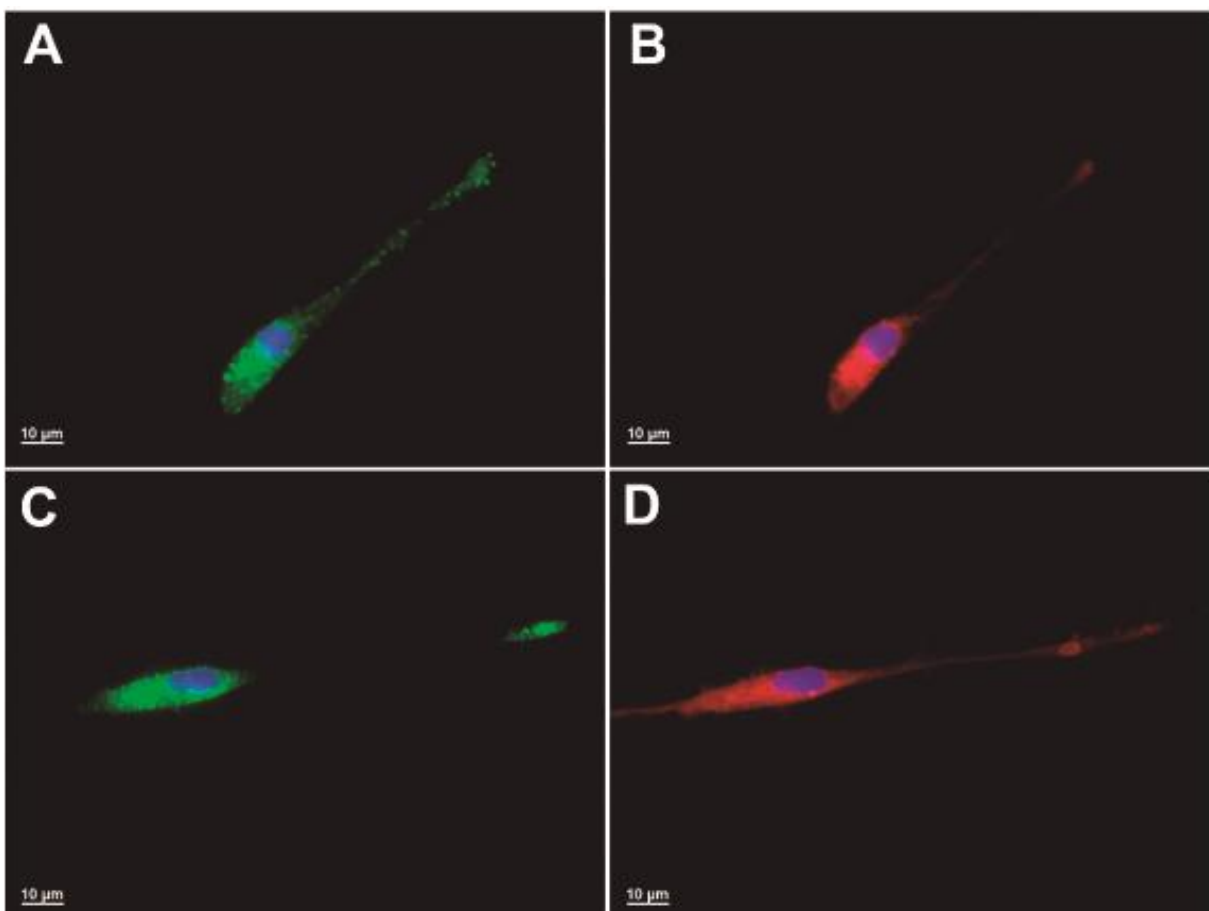


**Figura 20: Gráfico do percentual de fibrócitos infectados com *L. (L.) amazonensis*.** Percentual de fibrócitos com parasitos aderidos (barra preta) e parasitos internalizados (Barra cinza). Teste t-student não pareado \* $p < 0,05$ . Foram realizados 3 experimentos com 3 lamínulas por tempo e quantificadas 300 células por lamínula na objetiva de 63x.

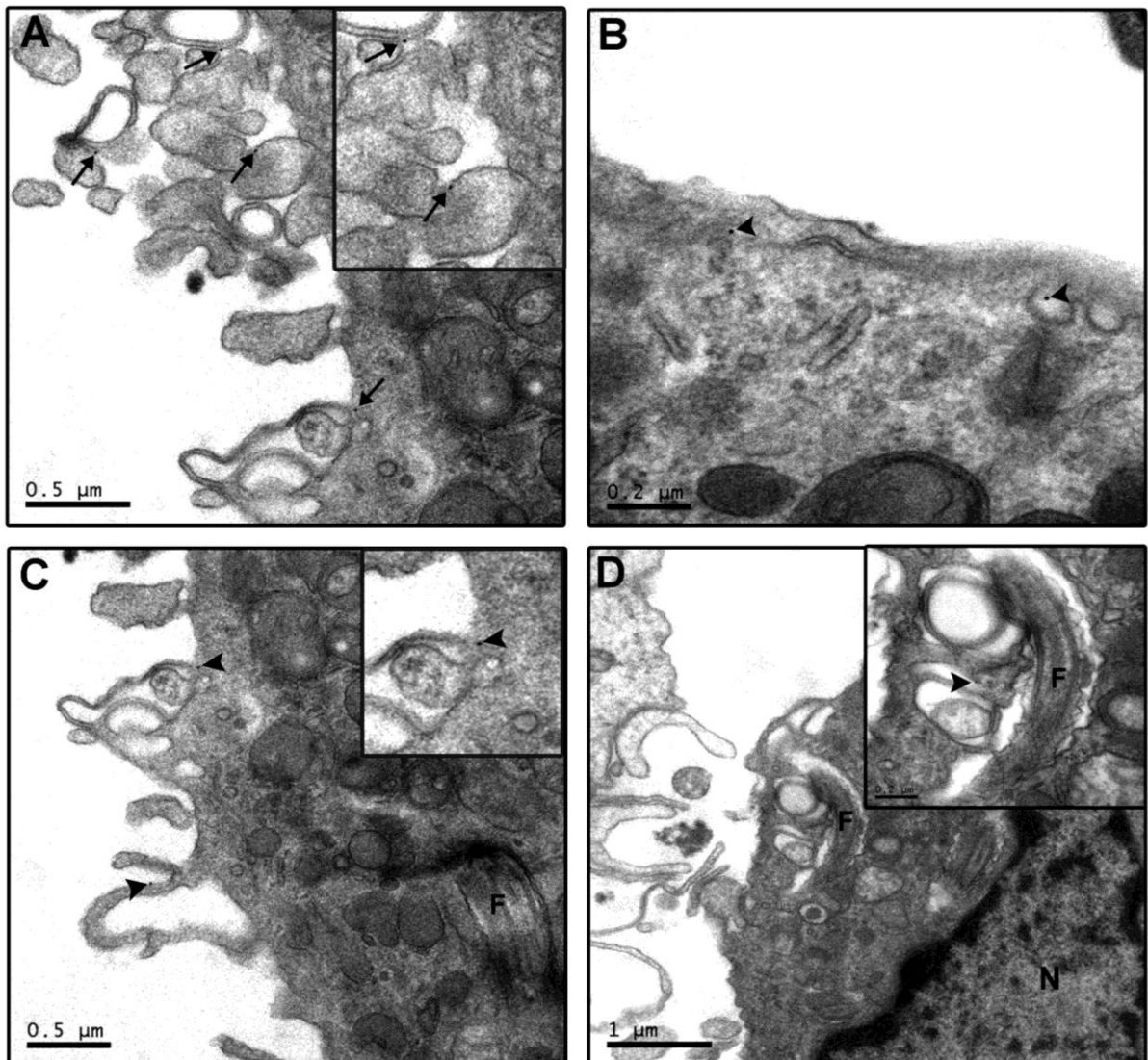




**Figura 21 (A-C): Caracterização morfológica da cultura primária de fibrócitos por microscopia eletrônica de transmissão após infecção com *L. (L.) amazonensis*.** Fibrócitos de cultura primária do sangue periférico de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentando **(A)** núcleo (N) com cromatina periférica contendo nucléolo único, retículo endoplasmático rugoso com perfil delgado (cabeça de seta), **(B)** fibrócitos com parasito (P) no interior de vacúolo parasitóforo e o citoplasma rico em mitocôndrias (M) e **(C)** parasita (P) recém endocitado apresentando flagelo (F) exteriorizado e cinetoplasto (seta) bem visível.



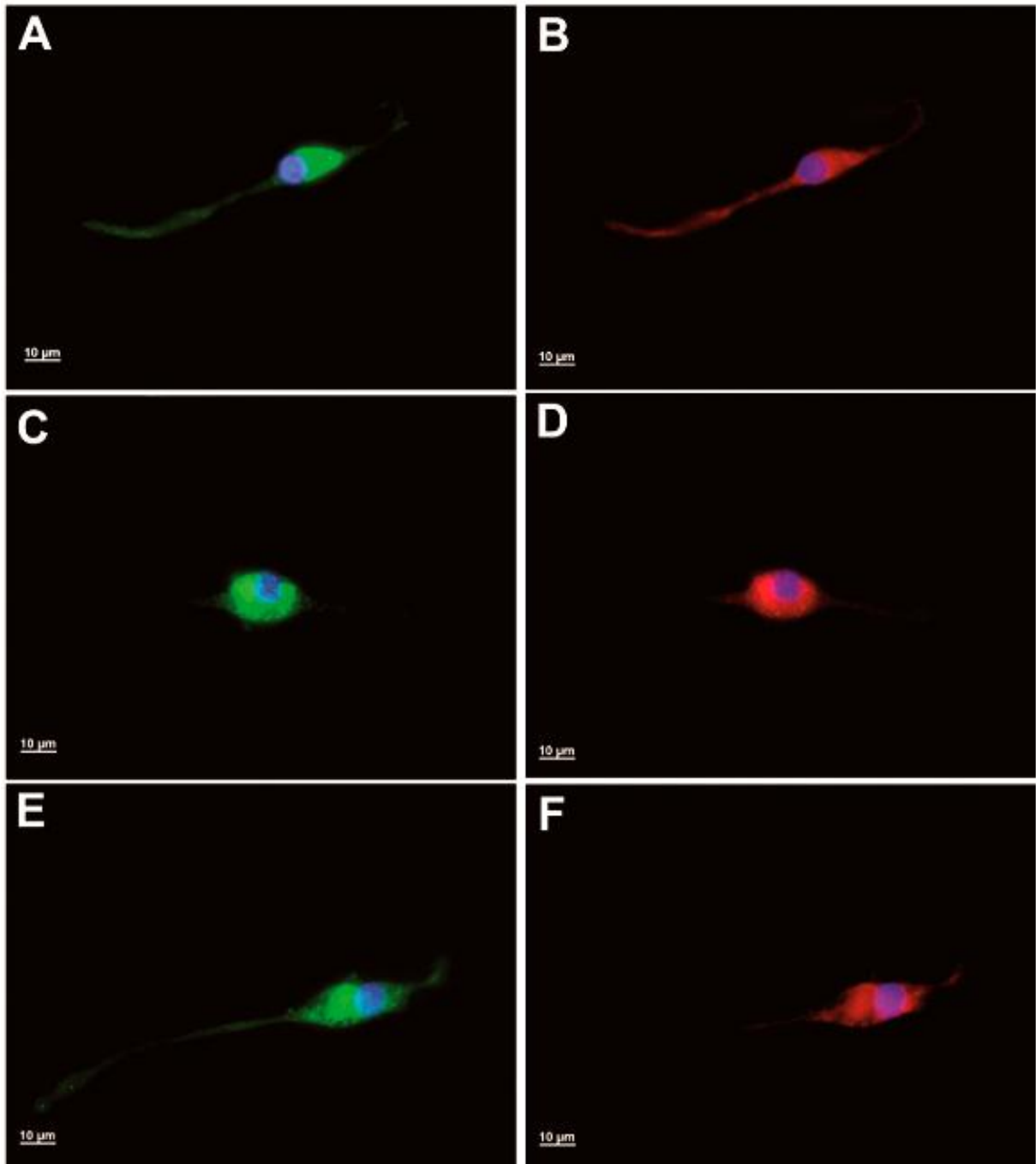
**Figura 22 (A–D):** Caracterização fenotípica das culturas de fibrócitos infectados por *L. (L.) amazonensis*. Fibrócitos de cultura primária do sangue periférico de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis* marcados com anti-CD45 FITC (A), anti-CD34/ alexa 488 (C), anti-HSP-47 TRITC (B/D).



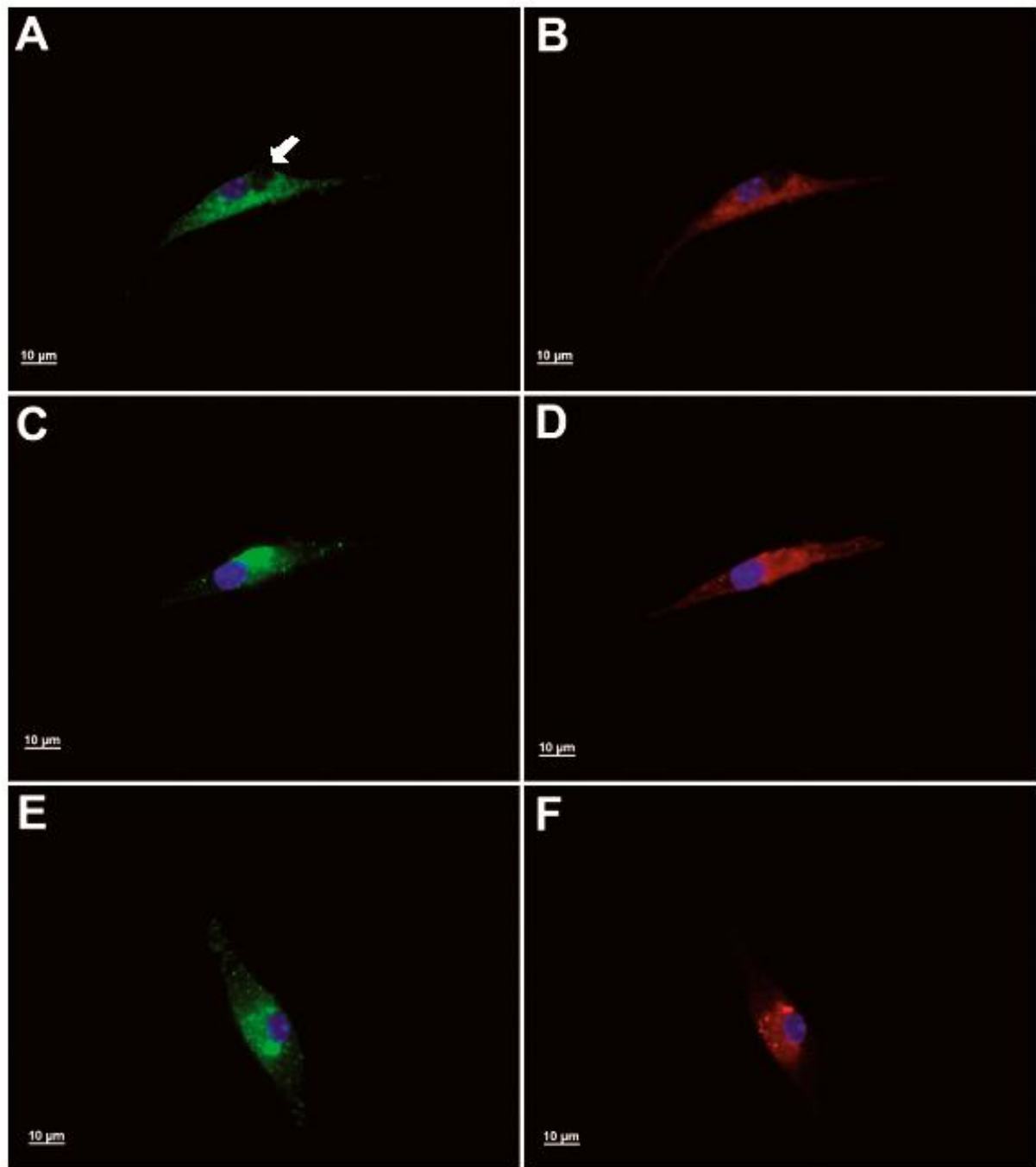
**Figura 23 (A–D):** Análise ultraestrutural da expressão de TLR-2 em fibrócitos. (F) flagelo, (N) núcleo. Fibrócitos não infectados (A–B) e infectados com *L. (L.) amazonensis* (C–D) apresentando marcação para TLR-2 em prolongamentos citoplasmáticos (seta) e no interior de vesículas (cabeça de seta).

### 3.7.3 Avaliação da expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (B7-1 e B7-2) em culturas de fibrócitos

Para analisar se os fibrócitos são capazes de expressar as moléculas MHC-II, B7-1 e B7-2, realizamos a técnica de imunofluorescência. A partir desta técnica, observamos em fibrócitos não infectados intensa marcação em verde para as moléculas MHC-II (Fig 24A), B7-1 (Fig 24C) e B7-2 (Fig 24E) bem distribuída por toda a superfície alongada dos fibrócitos. Após 24 horas de infecção não observamos diferenças na intensidade da expressão destas moléculas, observada em verde para MHC-II (Fig 25A), B7-1 (Fig 25C) e B7-2 (Fig 25E). Contudo a marcação se mostrou mais pontual e menos concentrada na periferia das células. As células analisadas também apresentavam intensa marcação em vermelho para HSP-47, realizadas para controle fenotípico (Figs 24B/D/F – 25B/D/F).



**Figura 24 (A–D): Análise da expressão de MHC-II, B7-1 e B7-2 em fibrócitos.** Fibrócitos de camundongos C57BL/6 marcados com anti- MHC-II / alexa flúor 488 (A), anti-B7-1 / alexa flúor 488 (C), anti-B7-2 / alexa flúor 488 (E) e anti-HSP-47 TRITC (B-D-F).

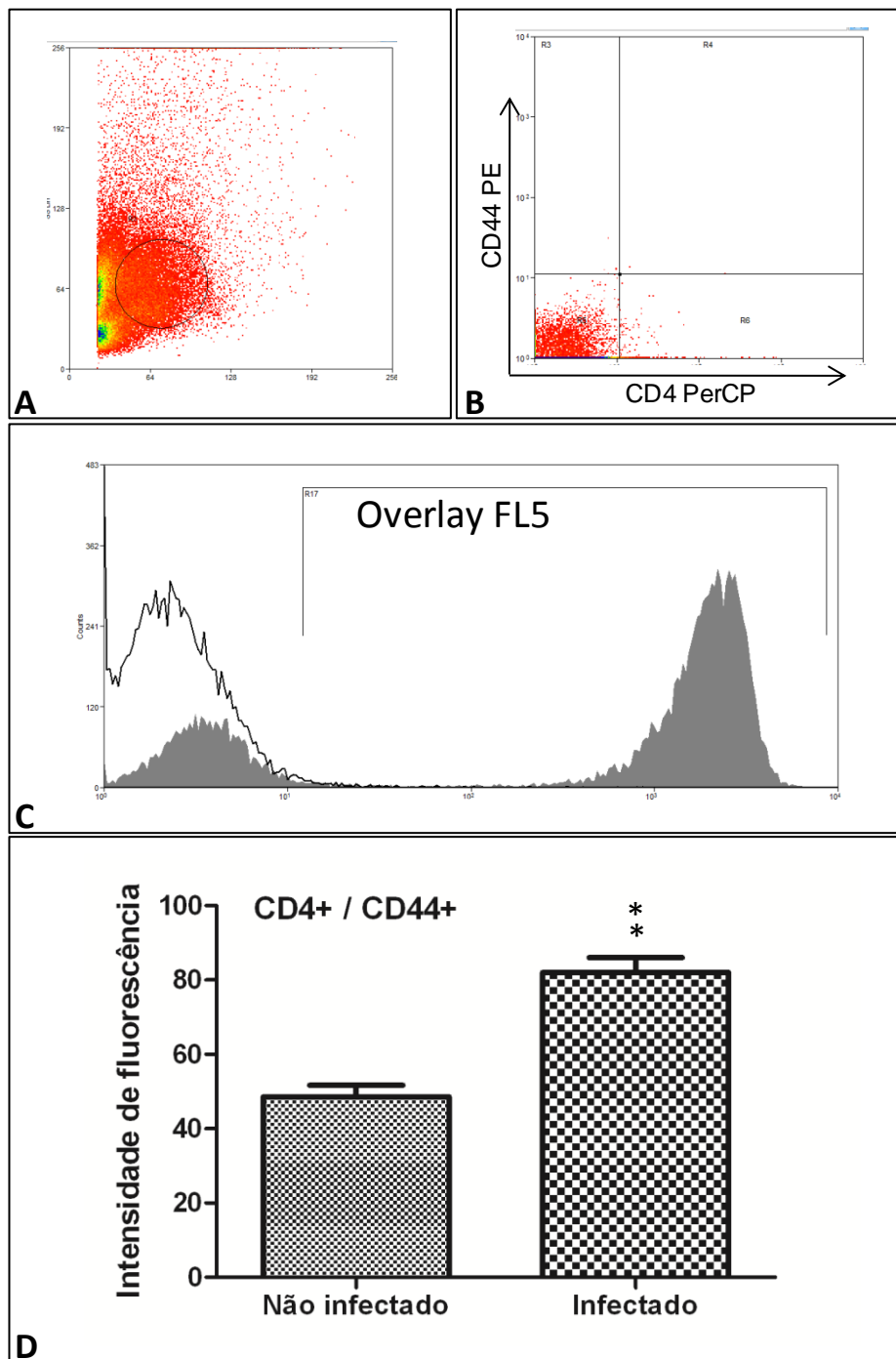


**Figura 25 (A–D):** Análise da expressão de MHC-II, B7-1 e B7-2 em fibrócitos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. Cultura de fibrócitos de sangue periférico de camundongos C57BL/6 infectadas com *L. (L.) amazonensis* mostrando fibrócito marcado com anti- MHC-II / alexa flúor 488, contendo vacúolo parasitóforo vazio (seta) **(A)**, Fibrócitos apresentando-se afilado, sem a presença de parasito marcado com anti-B7-1 / alexa flúor 488 **(C)** e anti-B7-2 / alexa flúor 488 **(E)**. AS culturas foram marcadas com anti-HSP-47 TRITC para controle fenotípico **(B-D-F)**.

#### 3.7.4 Ensaio de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> após co-cultivo com fibrócitos

Para avaliar a capacidade dos fibrócitos em induzir a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, analisamos a expressão de CD44 (marcador de ativação) em linfócitos por citometria de fluxo após 72 horas de co-cultivo. Inicialmente, demarcamos a população de interesse no dot plot da população total através do retrogate da marcação para CD4 (FL2) (Fig 26A). As amostras foram analisadas utilizando os valores da mediana (intensidade de fluorescência) do histograma da marcação de CD44 (FL5) (Fig 26C).

Nossos resultados demonstraram que fibrócitos não infectados induziram a expressão de CD44 dos linfócitos após 72 horas de co-cultivo. Entretanto, fibrócitos infectados foram capazes de aumentar em 64% a expressão destas moléculas na superfície dos linfócitos (Fig 26D).



**Figura 26 (A-D): Análise da ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> por fibrócitos. A:** Dot plot (FSC e SSC) mostrando a população total de linfócitos. **B:** Dot plot dos controles negativos FL2 e FL5. **C:** Histograma mostrando overlay dos controles negativo (gráfico aberto) e positivo (gráfico fechado) para FL5. **D:** Gráfico da intensidade de fluorescência da molécula CD44 em linfócitos após co-cultivo com fibrócitos.



#### 4. DISCUSSÃO

Os fibrócitos foram inicialmente identificados pelo seu recrutamento rápido para os tecidos lesionados (BUCALA *et al.*, 1994; ABE *et al.*, 2001), por participar da resposta inflamatória contra alguns patógenos (CHESNEY *et al.* 1998) e por atuar diretamente na resposta imune através do reconhecimento, apresentação antigênica e produção de citocinas e quimiocinas (BALMELLI *et al.*, 2008; CHESNEY *et al.*, 1997; CHESNEY *et al.*, 1998). A análise destes estudos nos levou a uma série de questões sobre a participação dos fibrócitos na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*. Existem evidências de que o fenótipo da doença pode ser determinado nas primeiras 24 horas após a infecção, sendo iniciado através do reconhecimento de PAMPs do parasito por PRRs presente na superfície das células hospedeiras, como os TLRs (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Diversos estudos relacionam os TLRs com a ativação da resposta inflamatória na infecção por *Leishmania* (DE VEER *et al.*, 2003; KROPF *et al.* 2004, FARIA; REIS; LIMA, 2012) e na modulação da expressão de moléculas envolvidas na apresentação antigênica (BLANDER, 2008). Nosso grupo vem demonstrando o envolvimento do TLR-2 na suscetibilidade de camundongos C57BL/6 na infecção inicial por *L. (L.) amazonensis* (GUERRA *et al.*, 2010). No presente estudo propomos analisar a resposta celular e capacidade de apresentação antigênica dos fibrócitos na infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Para investigar a presença dos fibrócitos no sítio de infecção utilizamos uma associação de marcadores como o antígeno pan-leucocitário CD45, e a proteína de choque térmico HSP-47 relacionada a produção de colágeno tipo I, utilizada na identificação de células produtoras de colágeno tipo I como fibroblastos de derme (KURODA, TAJIMA, 2004). Essa associação de marcadores nos permitiu diferenciar o fibrócitos dos demais tipos celulares encontrados nos tecidos. Inicialmente investigamos a presença de fibrócitos na derme auricular íntegra dos camundongos C57BL/6.

Nossas análises sobre a presença de fibrócitos na derme demonstram a presença de um número reduzido de fibrócitos, tanto nos animais controle quanto nos animais inoculados somente com PBS, demonstrando que somente a lesão tecidual inicial, causada pelo veículo não induz um recrutamento significativo de

fibrócitos para o sítio analisado. Entretanto, notamos o aumento no número de fibrócitos na derme auricular de camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2 nas primeiras semanas de infecção com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, demonstrando que o recrutamento observado foi dependente da presença do parasito. Estes resultados corroboram dados apresentados na literatura sobre o aparecimento de fibrócitos em sítios de lesão (BUCALA *et al.*, 1994; ABE *et al.*, 2001),

Ao analisarmos o número de fibrócitos presentes no sítio de infecção, notamos que os animais KO TLR-2 apresentaram o dobro do número de fibrócitos encontrado em animais WT C57BL/6 após 15 dias. Este resultado pode estar relacionado com a participação do TLR-2 na inibição da diferenciação de monócitos em fibrócitos sugerida por Maharjan, Pilling e Gomer (2010). Neste trabalho foi demonstrado que a ligação de agonistas a TLR-2 inibe indiretamente a diferenciação de monócitos em fibrócitos.

A participação dos TLRs na resposta inicial a infecção por *Leishmania* vem sendo descrita nos últimos anos, onde diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram o envolvimento da via de sinalização dependente de MyD88 na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12p40, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  e TNF- $\alpha$  (HAWN *et al.*, 2002; DEBUS *et al.*, 2003, DE VEER *et al.*, 2003; DE TREZ *et al.*, 2004). Balmelli *et al.* (2008) descreveram que os fibrócitos respondem a estímulos com ligantes de receptores TLR 2, 4, 7 ou 3 levando à rápida translocação do fator de transcrição NF-kB e produção de citocinas como a IL-6. Ao avaliarmos a participação dos TLR-2 de fibrócitos no reconhecimento dos parasitos presentes no sítio de infecção verificamos a redução gradual do percentual de fibrócitos expressando TLR-2 ao longo da infecção, fato que não foi observado nos animais WT C57BL/6 inoculados somente com PBS. Estes dados sugerem que a modulação deste receptor pode estar relacionada com a internalização dos parasitos e com a formação dos endossomas, uma vez que os TLRs participam diretamente da via endocítica através internalização e maturação de fagossomos (BLANDER, MEDZHITOV, 2004; BLANDER, MEDZHITOV, 2006; BLANDER, 2008).

Em nosso estudo *in vivo*, avaliamos a capacidade dos fibrócitos de responder à infecção através da análise da produção de citocinas em animais WT C57BL/6 e KO TLR-2. Nossos dados demonstraram um aumento do percentual de fibrócitos

produzindo TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  no sítio de lesão no primeiro dia de infecção e fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  nas duas semanas seguintes a infecção em ambos os camundongos analisados, demonstrando que estes produzem um misto de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias nas primeiras 24 horas de infecção. Estes dados são corroborados por Ji et al (2003) que demonstraram que a resposta do hospedeiro a infecção por *L. (L.) amazonensis* pode exibir um fenótipo intermediário, no qual ocorre um balanço entre a resposta Th1/Th2 levando à suscetibilidade da maioria das linhagens de camundongos. Além disso, o alto percentual de fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  encontrados ao longo da infecção pode ser importante para modular o crescimento, a maturação e a diferenciação de muitos tipos celulares, além de modular a atividade endocítica de fagócitos e de estimular a apresentação de antígenos através de moléculas de MHC (SCHRODER et al, 2004). Portanto os fibrócitos podem estar participando da resposta celular na derme durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

A pele representa o principal órgão envolvido na infecção por *Leishmania*. Neste sítio, as células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, as células de Langerhans (LC) desempenham um importante papel na iniciação da resposta imune antígeno específicas através da ativação de linfócitos T (WILL et al., 1992; MOLL; FLOHÉ; RÖLLINGHOFF, 1995). A ativação de linfócitos T requer no mínimo dois eventos de sinalização, o primeiro sinal emitido pela ligação do complexo antígeno/MHC-II ao receptor TCR e o segundo sinal também chamado de sinal co-estimulador necessário para a completa ativação do linfócito (CHAMBERS; ALLISON, 1997; MBOW; DEKREY; TITUS, 2001). O sinal co-estimulatório gerado pela ligação de moléculas da família B7 tem sido proposto por influenciar na ativação de linfócitos T e por ser crucial para o resultado da infecção por *Leishmania major* (CORRY et al., 1994; ELLOSO; SCOTT, 1999).

Estudos demonstram que a endocitose de amastigotas de *L. (L.) major* por LC modula positivamente a expressão de B7-1, B7-2, CD40, ICAM-1 e MHC-II (VON STEBUT et al., 1998). Nossos resultados demonstraram um aumento expressivo no percentual de fibrócitos expressando MHC-II, B7-1 e B7-2 na derme de camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2 comparados aos animais não inoculados ou inoculados com PBS. Sendo assim, podemos sugerir a participação dos fibrócitos na apresentação antigênica, podendo atuar como um elo entre a resposta imune inata e a adaptativa. Embora trabalhos científicos demonstrem a participação dos TLRs na

endocitose, secreção de citocinas inflamatórias e regulação de moléculas envolvidas na apresentação antigênica (SCHJETNE *et al.*, 2003), em nossos resultados não encontramos diferenças significativas na resposta celular e na apresentação antigênica dos fibrócitos presentes no sítio de infecção de animais KO TLR-2 comparados aos animais WT C57BL/6.

As células apresentadoras de antígenos presentes na pele como as LC, não têm somente o papel de apresentar antígenos no local, mas também de internalizar os parasitas e migrar para o linfonodo drenante onde elas podem ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos (MOLL *et al.*, 1993). Embora esta seja a forma mais conhecida para a chegada dos antígenos até os linfócitos antígeno-específicos nos linfonodos, estudos recentes têm descrito a atuação de células dendríticas residentes no linfonodo como principais células ativadoras de linfócitos T. Estas recebem antígenos a partir da drenagem imediata de antígenos solúveis liberados pela morte dos parasitas na pele através da linfa ou pela atuação dos monócitos que migram dos sítios de infecção carreando os antígenos para os linfonodos (TAKAHARA *et al.*, 2002; ITANO, JENKINS, 2003; SIXT *et al.*, 2005; IEZZI *et al.*, 2006).

Para avaliar a capacidade dos fibrócitos em atuar na resposta celular e na apresentação antigênica no linfonodo drenante analisamos o percentual de fibrócitos, produção de citocinas e expressão de MHC-II, B7-1, B7-2. Nossos dados revelaram que os fibrócitos foram encontrados em grande número nos linfonodos drenantes de animais não inoculados ou inoculados com PBS, diferente do que foi observado nos animais infectados, sugerindo que estas podem ser células residentes neste órgão linfóide.

As análises das citocinas nos linfonodos mostraram que os animais WT C57BL/6 apresentaram percentual de fibrócitos significativamente elevados produzindo IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  nas primeiras 24 horas. Após este período observamos percentual significativo de fibrócitos IFN- $\gamma$  positivos. A IL-4 é uma importante citocina que está envolvida no estabelecimento da resposta de caráter Th2 e no favorecimento da proliferação de parasitas do gênero *Leishmania* (NOBEN-TRAUTH, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2006). Entretanto dados da literatura demonstram que a suscetibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* está relacionada principalmente com a produção de IL-10, diferente do que ocorre na infecção com *Leishmania major*, onde a IL-4 exerce o papel principal no

desenvolvimento da resposta imune Th2 (BELKAID *et al.*, 2001). Pois a IL-10 apresenta um importante papel imunoregulatório na fase inicial da infecção por *Leishmania*, sendo capaz de modular a ação de citocinas pró-inflamatórias facilitando assim a proliferação do parasito (JONES *et al.*, 2002). Contudo, o alto percentual de fibrócitos produzindo IFN- $\gamma$  encontrados ao longo da infecção pode ser importante para a maturação de muitos tipos celulares e para estimular a apresentação de antígenos através de moléculas de MHC (SCHRODER *et al.*, 2004).

Por outro lado, observamos nos animais KO TLR-2 um aumento expressivo do percentual de fibrócitos produzindo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  a partir do primeiro dia, passando a apresentar percentuais elevados para IL-4 e IFN- $\gamma$  no 15<sup>o</sup> dia de infecção. A habilidade de células inflamatórias em responder a infecção e eliminar o parasito é dependente do equilíbrio entre uma variedade de fatores imunes adicionais, como produção de citocinas pró e anti-inflamatórias que determinarão o caráter da resposta imune. Estudos demonstram que citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são importantes na ativação dos macrófagos capacitando-os a matar a *Leishmania* (TITUS; KELSO; LOUIS, 1994; LIEW; LI; MILLOTT, 1990). Entretanto, outros estudos mostraram que IL-4 e IFN- $\gamma$  também podem agir sinergisticamente potencializando este processo (BOGDAN *et al.*, 1991; BARRAL *et al.*, 1995). Estes dados corroboram os nossos resultados, sugerindo que na ausência de TLR-2 os fibrócitos responderiam de forma pró-inflamatória, podendo atuar no controle da infecção através da indução de mecanismos leishmanicidas e da apresentação antigênica.

Ao avaliarmos a expressão de moléculas envolvidas na apresentação antigênica no linfonodo observamos a possível participação do TLR-2 neste processo. Fibrócitos de animais WT C57BL/6 não inoculados ou inoculados com PBS pareciam expressar MHC-II, B7-1 e B7-2 constitutivamente, contudo estes animais apresentaram uma intensa redução no percentual de fibrócitos expressando MHC-II e B7-1 a partir do 1<sup>o</sup> dia de infecção. Mas isto não foi observado nos animais KO TLR-2, sugerindo que a modulação negativa ocasionada pela infecção no animal WT C57BL/6 pode estar relacionada com a sinalização de TLR-2, como também pela produção de citocinas anti-inflamatórias nas primeiras 24 horas de infecção.

Embora nossos resultados tenham demonstrado a presença de fibrócitos no sítio de infecção e no linfonodo de camundongos WT C57BL/6 e KO TLR-2 desde os

primeiros momentos da infecção por *L. (L.) amazonensis*, nossos dados não revelaram se estas células poderiam induzir ativação de linfócitos T.

Em nosso modelo os fibrócitos apresentaram morfologia compatível com a descrita por outros autores onde observamos células alongadas, sem formar monocamada, eventualmente arredondadas e com projeções citoplasmáticas (BUCALA et al. 1994; ZHU et al. 2000; YANG et al. 2002; BALMELI et al. 2005). A partir da análise ultraestrutural confirmamos um conjunto de características presentes nos fibrócitos que os diferem de outros tipos celulares, dentre elas estão, núcleo com cromatina periférica e nucléolo único, retículo endoplasmático rugoso distribuído em rede com perfil delgado, citoplasma rico em mitocôndrias e muitos prolongamentos citoplasmáticos. Além disso, fibrócitos cultivados apresentaram marcação para uma associação de moléculas envolvidas em sua caracterização fenotípica como o antígeno pan-leucocitário (CD45), marcador de célula pluripotente CD34 e produção de colágeno (HSP-47) (BUCALA et al., 1994; PILLING et al., 2009).

Ao analisarmos a infecção dos fibrócitos por *L. (L.) amazonensis* observamos que não houve alterações no perfil fenotípico e morfológico destas células. Além disso, verificamos que as promastigotas aderem à membrana plasmática dos fibrócitos, são endocitadas e destruídas pelo fibrócito nas primeiras 24 horas de infecção, diferente do que foi observado quando fibrócitos foram infectados com a espiroqueta *Borellia burgdorferi*, agente etiológico da doença de Lyme (GRAB et al., 1999), onde os autores observaram que as bactérias se enrolavam nas projeções citoplasmáticas da célula, mas não eram endocitadas e sugeriram que estas células poderiam proteger a *Borellia* da resposta imune do hospedeiro.

Estudos indicam que após infecção *in vitro* com *L. (L.) donovani* macrófagos sofrem modulação negativa na expressão de moléculas requeridas para apresentação antigênica como B7-1 (KAYE et al., 1994; SAHA et al., 1995). Contudo, isso não acontece quando macrófagos são infectados com *L. (L.) major* mantendo a expressão normal das moléculas B7-1 e B7-2, sugerindo que a modulação nas moléculas co-estimulatórias pode estar relacionada com a espécie de *Leishmania* envolvida (BRODSKYN; DEKREY; TITUS, 2001). Nos modelos de infecção viral e infecção por toxóide tetânico fibrócitos expressam todas as moléculas requeridas para apresentação antigênica como MHC I/ II e moléculas co-estimulatórias (B7-1 e B7-2) (CHESNEY et al., 1997; BALMELLI et al., 2005).

Nossos resultados *in vitro* mostraram que fibrócitos expressam MHC-II, B7-1 e B7-2 constitutivamente, contudo não foi possível observar diferenças na expressão destas moléculas entre fibrócitos não infectados e infectados com *L. (L.) amazonensis*.

A interação de células apresentadoras de antígenos com linfócitos pode modular positivamente as moléculas envolvidas na apresentação antigênica, incluindo B7-1 e B7-2, o que parece estar relacionado com a produção de citocinas durante o co-cultivo que influenciam de forma direta ou indireta na expressão destas moléculas e na ativação de linfócitos (DING *et al.*, 1993; ELLOSO; SCOTT, 1999). A expressão de algumas moléculas na superfície dos linfócitos são utilizadas para rastrear seu estado de ativação, dentre elas a molécula CD44 que é uma glicoproteína de superfície e participa em vários processos fisiológicos e patológicos (KATOH *et al.*, 2011). É descrito como um marcador de ativação celular em decorrência do aumento de sua expressão após estimulação dos linfócitos T. Além disso, CD44 tem envolvimento na migração dos linfócitos para os sítios de inflamação uma vez que possui grande afinidade pelo ácido hialurônico, que é altamente expresso nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (LESLEY; HYMAN; KINCADE, 1993; KINCADE *et al.*, 1997; KATOH *et al.*, 2011). Em nosso modelo, fibrócitos não infectados induziram a expressão de CD44 dos linfócitos após 72 horas de co-cultivo. Contudo, fibrócitos infectados foram capazes de aumentar em 64% a expressão destas moléculas na superfície dos linfócitos, sugerindo que os fibrócitos participam da ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> antígeno específicos após a infecção com *L. (L.) amazonensis*.

## 5 CONCLUSÃO

Os fibrócitos são recrutados para o sítio de lesão nos momentos iniciais da infecção, sendo capazes de produzir citocinas e participar da resposta à infecção por *L. (L.) amazonensis*.

No sítio de infecção os fibrócitos são induzidos a expressar MHC-II, B7-1 e B7-2 podendo participar da manutenção da apresentação de antígenos durante as primeiras semanas de infecção.

Os fibrócitos são encontrados nos linfonodos de animais não inoculados sugerindo que estes possam ser células residentes neste órgão.

No linfonodo os fibrócitos de animais WT C57BL/6 foram capazes de produzir as citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no primeiro dia de infecção, sugerindo a participação destas células na modulação da apresentação antigênica.

Na ausência de TLR-2 os fibrócitos presentes no linfonodo produziram TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que podem estar relacionadas com a ativação celular e aumento da capacidade de apresentação antigênica destas células durante a infecção.

Os fibrócitos podem participar da apresentação antigênica no linfonodo drenante após a infecção por *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, a redução significativa no percentual destas células expressando MHC-II e B7-1 nos linfonodos de animais WT C57BL/6 pode estar relacionada a presença do TLR-2, sugerindo a participação deste receptor na modulação da apresentação antigênica durante a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

Os fibrócitos são capazes de atuar como células apresentadoras de antígenos na infecção *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*, pois endocitam e eliminam os parasitos nas primeiras 24 horas de infecção, expressam MHC-II, B7-1 e B7-2 e induzem a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> antígenos específicos.



## REFERÊNCIAS

- ABE, R.; DONNELLY, S.C.; PENG, T. *et al.* Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*, v.12, p.7556-62, 2001.
- AKIRA, S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, v.278, n.40, p.38105-8, 2003.
- AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A. *et al.* First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med*, v.101, n.7, p.735-7, 2007.
- BALMELLI, C.; RUGGLI, N.; MCCULLOUGH, K. *et al.* Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells. *J Leukoc Biol*, v.6, p.923-33, 2005.
- BALMELLI, C.; ALVES, M.P.; STEINER, E. *et al.* Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology*, v.212, p.693-9, 2008.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, v.18, p.767-811, 2000.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JÚNIOR, G. *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.
- BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P. *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol*, v.147, n.4, p.947-54, 1995.
- BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*, v.4, n.6, p.601-9, 2004.
- BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S. *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. *J Exp Med*, v.194, n.10, p.1497-506, 2001.
- BELLINI, A.; MATTOLI, S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*, v.87, p.858-70, 2007.
- BEUTLER, B. Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.43, p.609-28, 2002.
- BLANCHARD, N.; SHASTRI, N. Cross-presentation of peptides from intracellular pathogens by MHC class I molecules. *Ann N Y Acad Sci*, v.1183, p.237-50, 2010.

BLANDER, J.M. Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors. *Ann Rheum Dis*, v.67, p.44-9, 2008.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol*, v.7, n.10, p.1029-35, 2006.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, v.304, n.5673, p.1014-8, 2004.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; ROLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology*, v. 189, p.356-96, 1993.

BOGDAN, C.; STENGER, S.; RÖLLINGHOFF, M. *et al.* Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol*, v.21, n.2, p.327-33, 1991.

BRADLEY, L.M. Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol*, v.15, n.3, p.343-8, 2003.

BRODSKYN, C.I.; DEKREY, G.K.; TITUS, R.G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun*, v.69, n.2, p.665-72, 2001.

BUCALA, R.; SPIEGEL, L.A.; CHESNEY, J. *et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*, v.1, p.71-81, 1994.

BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y.; MAUËL, J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun*, v.55, n.3, p.587-93, 1987.

BURKE, B.; AHMAD, R.; STAPLES, K.J. *et al.* Increased TNF expression in CD43++ murine blood monocytes. *Immunol Lett*, v.118, n.2, p.142-7, 2008.  
*Cell Biol*, v.9, p.635-641, 1997.

CHAMBERS, C.A.; ALLISON, J. P. Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 1997. **9**: 396-404.

CHESNEY, J.; METZ, C.; STAVITSKY, A.B. *et al.* Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol*, v.1, p.419-25, 1998.

CHESNEY, J.; BACHER, M.; BENDER, A. *et al.* The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.12, p.6307-12, 1997.

CORRY, D. B.; REINER, S. L.; LINSLEY, P. S. *et al.* Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J. Immunol*, v.153, p.4142-48, 1994.

COURRET, N.; PRINA, E.; MOUGNEAU, E. *et al.* Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol*, v. 29, n.3, p.762-73, 1999.

CRUVINEL, W.DE M.; MESQUITA, D. JR.; ARAÚJO, J.A. *et al.* Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol*, v.50, n.4, p.434-61, 2010.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanism in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Biology*, v.72, p.132-41, 2002.

DE TREZ, C.; BRAIT, M.; LEO, O. Myd88-dependent in vivo maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species. *Infect Immun*, v.72, n.2, p.824-32, 2004.

DE VEER. M.J.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T.M. *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immuno*, v.33, n.10, p.2822-31, 2003.

DEBUS, A.; GLÄSNER, J.; RÖLLINGHOFF, M. *et al.* High levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infection and Immunity*, v.71, n.12, p.7215-18, 2003.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, v.343, n.1, p.37-49, 2000.

DEMPSEY, P.W.; VAIDYA, S.A.; CHENG, G. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci*, v.60, n.12, p.2604-21, 2003.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1455, p.341-52, 1999.

DIACONU, C.C.; NEAGU, A.I.; LUNGU, R. *et al.* Plasticity of regulatory T cells under cytokine pressure. *Roum Arch Microbiol Immunol*, v.9, n.4, p.190-6, 2010.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; RÖLLINGHOFF, M. *et al.* Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. *Science*, v.284, n.5416, p.951-5, 1999.

DING, L.; LINSLEY, P.S.; HUANG, L.Y. *et al.* IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol*, v.151, n.3, p.1224-34, 1993.

DONALDSON, J.G.; WILLIAMS, D.B. Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. *Traffic*, v.10, p.1745-52, 2009.

ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. Expression and contribution of B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J. Immunol*, v.162, p.6708-15, 1999.

FARIA, M.S.; REIS, F.C.; LIMA, A.P. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res*; 2012:930257. Epub 2012 Mar 15.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, v.147, n.11, p.3815-22, 1991.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J.A. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol*, v.150, n.5, p.1857-64, 1993.

GALLOIS, A.; KLEIN, J.R.; ALLEN, L.A. *et al.* Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol*, v.166, n.9, p.5741-8, 2001.

GARCÍA-GARCÍA, E.; ROSALES, C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, v.72, n.6, p.1092-108, 2002.

GEISSMANN, F.; AUFRAY, C.; PALFRAMAN, R. *et al.* Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*, v5, p.398-408, 2008.

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v.327, p.656–661, 2010.

GEISSMANN, F.; PROST, C.; MONNET, J.P. *et al.* Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, v.187, n.6, p.961-6, 1998.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, v.1, p.71-82, 2003.

GOMER, R.H.; PILLING, D.; KAUVAR, L.M. *et al.* A serum amyloid P-binding hydrogel speeds healing of partial thickness wounds in pigs. *Wound Repair Regen*, v.3, p.397-404, 2009.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GRAB, D.J.; LANNERS, H.; MARTIN, L.N. *et al.* Interaction of *Borrelia burgdorferi* with peripheral blood fibrocytes, antigen-presenting cells with the potential for connective tissue targeting. *Mol Med*, v.1, p46-54, 1999.

GRAB, D.J.; SALEM, M.L.; DUMLER, J.S. *et al.* A role for the peripheral blood fibrocyte in leishmaniasis? *Trends Parasitol*, v.20, p.12, 2004.

GREGORY, D.J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, v.130, p.27-35, 2005.

GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R.D. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; (6): 645-61.

GUERRA, C.S.; SILVA, R.M.; CARVALHO, L.O. *et al.* Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Exp Pathol*, v.91, n.5, p.451-9, 2010.

GUIMARÃES, E.T.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. *et al.* Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect*, v.8, n.5, p.1219-26, 2006.

HAWN, T.R.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M. *et al.* *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect*, v.4, n.8, p.763-71, 2002.

HERZOG, E.L.; BUCALA, R. Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol*, v.7, p.548-56, 2010.

HIRAHARA, K.; VAHEDI, G.; GHORESCHI, K. *et al.* Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology*, v.134, n.3, p.235-45, 2011.

HONG, K.M.; BELPERIO, J.A.; KEANE, M.P. *et al.* Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, v.31, p.22910-20, 2007.

HORTA, M.F.; MENDES, B.P.; ROMA, E.H. *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res*, v.2012, p.203818, 2012.

HUBER, M.; TIMMS, E.; MAK, T.W. Röllinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun*, v.66, n.8, p.3968-70, 1998.

HUGUES, S. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. *Semin Immunopathol*, v.32, n3, p.227-38, 2010.

HUYNH, K.K.; KAY, J.G.; STOW, J.L. *et al.* Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. *Physiology*, v.22, p.366-72, 2007.

IEZZI, G.; FRÖHLICH, A.; ERNST, B. *et al.* Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J Immunol*, v.177, n.2, p.1250-6, 2006.

ITANO, A.A.; JENKINS, M.K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*, v.4, n.8, p.733-9, 2003.

IWASAKI, H.; AKASHI, K. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, v.26, p.726–740, 2007.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol*, v.20, p.197–216, 2002.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity* 2003; 71 (8): 4278-88.

JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U. *et al.* Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun*,v.70. n.4, p.2151-8, 2002.

JORGENSEN, K.W.; BUUS, S. NIELSEN, M. Structural properties of MHC class II ligands, implications for the prediction of MHC class II epitopes. *PLoS One*, v.5, n.2, p.158-77, 2010.

JOSHI, T.; BUTCHAR, J.P.; TRIDANDAPANI, S. Fcγ receptor signaling in phagocytes. *Int J Hematol*,v.84, n.3, p.210-6, 2006.

KATOH, S.; KAMINUMA, O.; HIROI, T. *et al.* CD44 is critical for airway accumulation of antigen-specific Th2, but not Th1, cells induced by antigen challenge in mice. *Eur. J. Immunol*, v.41, p. 3198–3207, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, v.11, n.5, p.373-84, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, v.9, n.8, p.604-15, 2011.

KAYE, P.M.; ROGERS, N.J.; CURRY, A.J. *et al.* Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol*, v.24, n.11, p.2850-4, 1994.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? *J. Glob. Infect*, v.2, p.177–185, 2010.

KINCADE, P. W.; ZHENG, Z.; KATOH, S. *et al.* The importance of cellular environment to function of the CD44 matrix receptor. *Curr. Opin. Immunol*. *J. Exp. Med*, v.188; p.1547-52, 1997.

KROPF, P.; FREUDENBERG, N.; KALIS, C. *et al.* Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J Leukoc Biol*, v.79, n.1, p.48-57, 2004.

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, v.388, n.4, p.621-5, 2009.

- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, v.30, n.1, p.16-34, 2011.
- KURODA, K.; TAJIMA, S. HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Cutan Pathol*, v.31, n.3, p.241-6, 2004.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, v.213, p.183-91, 2008.
- LESLEY, J.; HYMAN, R.; KINCADE, P.W. CD44 and its interaction with the extracellular matrix. *Adv. Immunol*, v.54, p. 271–335, 1993.
- LIAO, W.W.; ARTHUR, J.W. Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. *Autoimmun Rev*, v.10, n.8, p.469-73, 2011.
- LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, v.213, p.377-87, 2008.
- LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*, v.71, n.4, p.556-9, 1990.
- LOCKSLEY, R.M.; REINER, S.L.; HATAM, F. *et al.* Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science*, v.261, n.5127, p.1448-51, 1993.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v.15, p.323, 1997.
- MAHARJAN, A.S.; PILLING, D.; GOMER, R.H. Toll-like receptor 2 agonists inhibit human fibrocyte differentiation. *Fibrogenesis Tissue Repair*, v.24, n.3, p.23, 2010.
- MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, v.27, p.451-83, 2009.
- MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, v.13, p.453-61, 2008.
- MATTE, C.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis*, v.185, n.5, p.673-81, 2002.
- MBOW, M.L.; DEKREY, G.K.; TITUS, R.G. *Leishmania major* induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells. *Eur J Immunol*, v.31, n.5, p.1400-9, 2001.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immunity. *N Engl J Med*, v.343, n.5, p.338-44, 2000.

MESQUITA, J.R.D.; CRUVINEL, W.M.; CÂMARA, N.O.S. *et al.* Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.6, p.476-486, 2009.

MOLL, H.; FLOHÉ, S.; RÖLLINGHOFF, M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur. J. Immunol*, v.25, p.693-699, 1995.

MOLL, H.; FUCHS, H. BLANK C. *et al.* Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol*, v.23, p.1595–1601, 1993.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, v.8, p.958-69, 2008.

MURRAY, H.W.; DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v.1, p.288-93, 2000.

NAIR, P.; AMSEN, D.; BLANDER, J.M. Co-ordination of incoming and outgoing traffic in antigen-presenting cells by pattern recognition receptors and T cells. *Traffic*, v.12, n.12, p.1669-76, 2011.

NIEDERMEIER, M.; REICH, B.; RODRIGUEZ GOMEZ, M. *et al.* CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.42, p.892-7, 2009.

NOBEN-TRAUTH, N. Susceptibility to *Leishmania major* infection in the absence of IL-4. *Immunol Lett*, v.75, n.1, p.41-4, 2000.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*, v.2, n.2, p.135-46, 2010.

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R.W.; REINER, N.E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.89, n.16, p.7481-5, 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis: background information.A brief history of the diseases. [online]; 2011. [capturado em : 13 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. *Lancet*, v.357, p.1777-89, 2001.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*, v.6, n.15, p.1382-7, 2004.



- PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K. *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.114, p.438–446, 2004.
- PILLING, D. BUCKLEY, C.D.; SALMON, M. *et al.* Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P. *J Immunol*, v.10, p.5537-46, 2003.
- PILLING, D.; TUCKER, N.M.; GOMER, R.H. Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes. *The Journal of Leukocyte Biology*, v.79, p.1242–1251, 2006.
- PILLING, D.; FAN, T.; HUANG, D. *et al.* Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One*, v.16, n.4, p.e7475, 2009.
- PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA LÃO, S. *et al.* Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol*, v.151, n.4, p.2050-61, 1993.
- QUAN, T.E.; COWPER, S.; WU, S.P. *et al.* Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*, v.4, p. 598-606, 2004.
- RACOOSIN, E.L.; BEVERLEY, S.M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp Parasitol*, v.85, n.3, p.283-95, 1997.
- RAMACHANDRA, L.; NOSS, E.; BOOM, W.H. *et al.* Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. *Cell Microbiol*, v.,1, n.3, p.205-14, 1999.
- REILKOFF, R.A.; BUCALA, R.; HERZOG, E.L. Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*, v.6, p.427-35, 2011.
- REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, v.13, p.151-77, 1995.
- REINER, N.E.; NG, W.; MA, T. *et al.* Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.85, n.12, p.4330-4, 1988.
- REINER, N.E.; NG, W.; MCMASTER, W.R. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol*, v.138, n.6, p.1926-32, 1987.
- SACKS, D.L.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* mice. *Nature Review of Immunology*, v.2, p.845-58, 2002.
- SAHA, B.; DAS, G.; VOHRA, H. *et al.* Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-

infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol*, v.25, n.9, p.2492-8, 1995.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, v.179, n.4, p.1109-18, 1994.

SCHJETNE, K.W.; THOMPSON, K.M.; NILSEN, N. *et al.* Cutting Edge: Link Between Innate and Adaptive Immunity: Toll-Like Receptor 2 Internalizes Antigen for presentation to CD4<sup>+</sup> T Cells and Could Be an Efficient Vaccine Target1. *J Immunol*, n.171, p.32-36, 2003.

SCHMIDT, M.; SUN, G.; STACEY, M. *et al.* Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma. *Journal of Immunology*, v.170, p.380-389, 2003.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, v.75, n.2, p.163-89, 2004.

SERBINA, N.V.; JIA, T.; HOHL, T.M. *et al.* Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, v.26, p.421-52, 2008.

SHAO, D.D.; SURESH, R.; VAKIL, V. *et al.* Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol*, v.6, p.1323-33, 2008.

SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, v.2, n.2, p.116-26, 2002.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In: Killick-Kendric R, Peters W(eds), *The Leishmaniases in biology and medicine*. London: Academic Press; p.1-120, 1987.

SIXT, M.; KANAZAWA, N.; SELG, T. M. *et al.* The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*, v.22, p.19-29, 2005.

STEIN, M.; KESHAV, S. HARRIS, N. *et al.* Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, v.176, n.1, p.287-992, 1992.

STEINMAN, R.M. Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Found Symp*, v.279, p.101-113, 2006.

SUNDERKÖTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M.J. *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, v.172, n.7, p.4410-7, 2004.

TAKAHARA, K., Y. OMATSU, Y. YASHIMA, Y. Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int. Immunol*, v.14, p.433–444, 2002.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, v.21, p.335-76, 2003.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, v.11, n.4, p.443-51, 1999.

TAYLOR, P.R.; GORDON, S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*, v.19, n.1, p2-4, 2003.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O. *et al.* Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*, v.291, n.5508, p.1544-7, 2001.

THORNTON, C.A.; MORGAN, G. Innate and adaptive immune pathways to tolerance. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, v.64, p45-61, 2009.

TITUS, R.G.; KELSO, A.; LOUIS, J.A. Intracellular destruction of *Leishmania tropica* by macrophages activated with macrophage activating factor/interferon. *Clin Exp Immunol*, v.55, n.1, p.157-65, 1984.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, v.7, n.3, p.179-90, 2007.

TULADHAR, R.; NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A.R. Role of co-stimulation in Leishmaniasis. *Int J Biol Sci*, v.7, n.9, p.1382-90, 2011.

UZONNA, J.E.; JOYCE, K.L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*, v.199, n.11, p.1559-66, 2004.

VAN DEN BERG, H.A.; MOLINA-PARÍS, C.; SEWELL, A.K. Specific T-cell activation in an unspecific T-cell repertoire. *Sci Prog*, v.94, n.3, p.245-64, 2011.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, v.173, p.6521-5, 2004.

VARCOE, R. L.; MIKHAIL, M.; GUIFFRE, A.K. *et al.* The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.4, p.1125–1133, 2006.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T. *et al.* Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in the activation and interleukin 12 release from murine-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med*, v.188, n.8, p.1547-52, 1998.

VYAS, J.M.; VAN DER VEEN, A.G.; PLOEGH, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, v.8, p.607–618, 2008.

WANG, J.; JIAO, H.; STEWART, T. *et al.* Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*, v.15, p.113–121, 2007.

WANG, S.; CHEN, L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol*, v.1, n.1, p.37-42, 2004.

WILL, A.; BLANK, C.; RÖLLINGHOFF, M. *et al.* Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*, v.22, n.6, p.1341-7, 1992.

WING, K.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*, v.11, p.7–13, 2010.

YANG, L.; SCOTT, P. G.; DODD, C. *et al.* Identification of fibrocytes in post burn hypertrophic scar. *Wound Repair and Regeneration*, v.13, p.398–404, 2005.

YANG, L.; SCOTT, P.G.; GIUFFRE, J. *et al.* Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells. *Laboratory Investigation*, v.82, p.1183–1192, 2002.

YONA, S. JUNG, S. Monocytes subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*, v.1, p.53-9, 2009.

ZHU, Y.D.; KOO, K.; BRADSHAW, J.D. *et al.* Macaque blood-derived antigen presenting cells elicit SIV-specific immune responses. *Journal Medical Primatology*, v.29, p.182–192, 2000.