



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**PRODUÇÃO DE METALOPROTEINASE – 9 POR
MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA**

Taís Menezes Cerqueira Campos

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2012

C198 Campos, Taís Menezes Cerqueira

Produção de metaloproteinase 9 por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea / Taís Menezes Cerqueira Campos. – Salvador, 2012.

98 f.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2012.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Monócitos. 3. Pacientes. I. Carvalho, Lucas Pedreira. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PRODUÇÃO DE METALOPROTEINASE – 9 POR
MONÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA**

Taís Menezes Cerqueira Campos

Professor-orientador: Lucas Pedreira de Carvalho

Professor Co-orientador: Sara Timóteo Passos

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), 2012

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- *National Institute of Health* - NIH
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - INCT-DT

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Dra. Camila Indiani de Oliveira, professora do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, professor adjunto da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública e pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Dr. Ricardo Gonçalves, professor adjunto de Patologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Membro Suplente:

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho, professor adjunto de Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e professor do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

*“Cérebros brilhantes também podem
produzir grandes sofrimentos.
É preciso educar os corações”.*

(Dalai Lama)

*Dedico este trabalho ao meu esposo,
Paulo Eduardo, aos meus pais, Aloísio
e Magali, e à minha irmã, Kaila.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus orientadores, Dr. Lucas Carvalho e Dra. Sara Passos, pelos ensinamentos, orientações, críticas e sugestões concedidas. Pela simplicidade e sabedoria que transmitiram à minha vida. Serei sempre grata pela oportunidade que me foi dada.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de mais uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a sua concretização.

À Deus, por me dar serenidade e sabedoria para o desenvolvimento deste projeto. E por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que permitiram esta realização.

À minha família, por todo carinho e compreensão. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao Dr. Edgar Carvalho, pela oportunidade de desenvolver este projeto no Serviço de Imunologia.

Ao Dr. Paulo Machado, pela confiança e oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa.

Às minhas queridas amigas, Giovana Bergheme e Rúbia Costa, por toda dedicação, ajuda e compreensão diária. Agradeço por fazerem parte desta conquista.

A toda equipe do Serviço de Imunologia, em especial, Andréa Magalhães e Daniela Celestino, por toda dedicação e solicitude.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra, em especial, ao Sr. Ednaldo Lago.

A toda equipe que dá suporte clínico na área endêmica, em especial, Dr. Luiz Henrique e Dr. Adriano Queiroz.

Aos colegas do programa de pós-graduação, por fazerem esta jornada agradável e enriquecedora.

Aos pacientes por colaborarem e permitirem a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

Índice de figuras	12
Lista de abreviaturas e siglas	13
I. Resumo	14
II. Objetivos	15
III. Introdução	16
IV. Revisão da Literatura	19
IV.1 Leishmaniose Tegumentar Americana	19
IV.1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e imunológicos	21
IV.1.2 Imunopatogênese da Leishmaniose	21
IV.2 Participação dos monócitos/macrófagos nas doenças inflamatórias e na leishmaniose	23
IV.2 Metaloproteinases de Matriz	25
V. Casuística, Material e Métodos	29
V.1 Área do estudo	29
V.2 Desenho do Estudo	29
V.3 Definições dos casos	29
V.3.1 Leishmaniose Cutânea Recente	29
V.3.2 Leishmaniose Cutânea	30
V.3.3 Controles Sadios	30
V.4 Critérios de Inclusão	30
V.5 Critérios de Exclusão	31
V.6 Metodologia	31
V.6.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico	31
V.6.2 Marcação de superfície celular para FACS	31
V.6.3 Marcação intracelular para FACS	32
V.6.4 Cultura de células mononucleares do sangue periférico	32
V.6.5 Cultura de células da biópsia	32
V.6.6 Dosagem dos níveis de MMP-9, TIMP-1 e TNF	33
V.7 Análises Estatísticas	34
V.8 Considerações Éticas	34

VI. Artigo	35
VII. Resultados	60
VII.1 MMP-9 é produzida por monócitos em pacientes com leishmaniose cutânea	60
VII.2 Monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea expressam MMP-9	61
VII.3 Desequilíbrio entre a produção de MMP-9 e TIMP-1 em pacientes com leishmaniose cutânea	63
VII.4 Lesões de pacientes com LC apresentam níveis elevados de MMP-9	64
VII.5 Pacientes com LC apresentam altos níveis de TNF	64
VII.6 TNF induz a produção de MMP-9	65
VII.7 Neutralização de TNF diminui a produção de MMP-9 em pacientes com LC	66
VIII. Discussão	67
IX. Perspectivas do estudo	72
X. Conclusão	73
XI. Sumary	74
XII. Referências	75
Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes	82
Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos	84
Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis de menores de 18 anos	85
Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para controles sadios	88
Anexo V. Normas para elaboração do artigo da revista <i>The Journal of Immunology</i>	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. MMP-9 é produzida por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea	60
Figura 2. Monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea expressam MMP-9	61
Figura 3. Desequilíbrio entre a produção de MMP-9 e TIMP-1 em pacientes com leishmaniose cutânea	63
Figura 4. Lesões de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam níveis elevados de MMP-9	64
Figura 5. Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam altos níveis de TNF	64
Figura 6. TNF induz a produção de MMP-9	65
Figura 7. Neutralização de TNF diminui a produção de MMP-9 em pacientes com leishmaniose cutânea	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacárideo
OMS	Organização Mundial de Saúde
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Th1	Células T auxiliaadoras do tipo 1
Th2	Células T auxiliaadoras do tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
NK	Células matadoras naturais
ON	Óxido nítrico
CD14	Grupo de diferenciação 14
CD16	Grupo de diferenciação 16
CD14++CD16-	Monócitos Clássicos
CD14++CD16+	Monócitos Intermediários
CD14+CD16++	Monócitos Não-clássicos
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
MHC II (HLA-DR)	Complexo de histocompatibilidade principal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CS	Controles Sadios
LCR	Leishmaniose Cutânea Recente
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
SSC	Tamanho da célula
FSC	Granulosidade da célula
RPM	Rotações por minuto
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Matriz Metaloproteinase
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

I. RESUMO

Produção de metaloproteinase – 9 por monócitos em pacientes com leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* é caracterizada pela presença de uma ou mais lesões ulceradas, de bordas elevadas. Células T CD4+ e CD8+ atuam como fonte produtora de citocinas que ativam macrófagos para destruição do parasita. Monócitos circulantes constituem uma população heterogênea, subdividida em: monócitos clássicos (CD14++CD16-), intermediários (CD14++CD16+) e não-clássicos (CD14+CD16++), e são conhecidos por migrarem para sítios inflamatórios e secretarem citocinas. TNF pode mediar a patologia da LC através de vários mecanismos entre eles, indução de óxido nítrico (NO), aumento de citotoxicidade e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). MMP-9 é uma enzima dependente de zinco, que degrada colágeno tipo IV, componente da membrana basal e, é controlada pelo TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1). Recentemente, foi demonstrada que a infecção de macrófagos por *L. braziliensis* aumenta a expressão de MMP-9. Embora os fatores que induzem a ruptura da membrana basal levando ao desenvolvimento da úlcera ainda não sejam conhecidos, é provável que a MMP-9 contribua para os danos teciduais na LC. **Objetivo:** investigar a contribuição das sub-populações de monócitos para produção de MMP-9. **Desenho do estudo:** Estudo transversal, com 28 pacientes com LC, 12 com LCR e 20 controles sadios. **Material e Métodos:** Células mononucleares foram obtidas de todos os participantes da pesquisa para a marcação *ex-vivo* das sub-populações de monócitos e MMP-9, e a frequência destas células foi determinada por citometria de fluxo. Realizou-se cultura por 72 horas estimulando as células com SLA e os níveis de MMP-9 e TIMP-1 nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. A contribuição de TNF para a produção de MMP-9 foi determinada na presença ou ausência de TNF recombinante em cultura de CMSP por 24 horas e os níveis de MMP-9 foram determinados por ELISA. **Resultados:** Monócitos foram as principais células produtoras de MMP-9 e as três sub-populações de monócitos de pacientes com LCR e LC expressaram mais MMP-9, quando comparados com as de indivíduos sadios. Em pacientes com LC a sub-população de monócitos não-clássicos foi a principal fonte produtora de MMP-9. Níveis elevados de MMP-9 e baixos níveis de TIMP-1 foram encontrados em sobrenadantes de cultura de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea. A presença de TNF em cultura de CMSP induziu a secreção de MMP-9. **Conclusão:** Altos níveis de TNF em pacientes com leishmaniose cutânea contribuem para a produção de MMP-9 por monócitos. **Palavras-chaves:** Leishmaniose cutânea, monócitos, metaloproteinases de matriz.

II. OBJETIVOS

II.1 GERAL

Investigar a contribuição das sub-populações de monócitos para produção de MMP-9.

II.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar os níveis de MMP-9 e TIMP-1 em sobrenadantes de CMSP de indivíduos saudáveis e pacientes com LCR, LC.
2. Determinar o efeito de TNF na produção de MMP-9 em CMSP de indivíduos saudáveis e pacientes com LCR, LC.
3. Determinar os níveis de MMP-9 em sobrenadantes de lesões de pacientes com LC.

III. INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) causada pela infecção por *Leishmania braziliensis* é caracterizada pela presença de uma ou mais lesões ulceradas de borda elevada e fundo granuloso (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984). Após a infecção, a maioria dos indivíduos desenvolve linfadenopatia, seguida do aparecimento de uma pápula. Posteriormente, a pápula se transforma em uma lesão exulcerativa a qual vai originar a úlcera (Barral, Barral-Netto *et al.*, 1992; Barral, Guerreiro *et al.*, 1995). As lesões de pacientes com LC são caracterizadas por um robusto infiltrado inflamatório incluindo a presença de linfócitos T e B, macrófagos, células de Langerhans e plasmócitos (Pirmez, Oliveira-Neto *et al.*, 1990; Da-Cruz, Bertho *et al.*, 2005). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, são detectados em biópsias de úlceras de pacientes com LC, essa citocina contribui para a destruição da *Leishmania*, porém induz dano tecidual, participando assim da patogênese da doença (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Bacellar, Lessa *et al.*, 2002; Da-Cruz, Bittar *et al.*, 2002; Gomes-Silva, De Cássia Bittar *et al.*, 2007).

Na infecção por *L. braziliensis* células TCD4⁺ e TCD8⁺ atuam como fonte produtora de citocinas para a ativação de monócitos e macrófagos (Brelaz, De Oliveira *et al.*, 2011; Da-Cruz, Bittar *et al.*, 2002). Os monócitos constituem uma população heterogênea, com diferentes sub-populações, que apresentam fenótipos e funções específicas. De acordo com a expressão de CD14 e CD16, estas células subdividem-se em monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock, Acunata *et al.*, 2010). Monócitos que expressam CD16⁺, intermediários e não-clássicos, têm sido associados com a patogênese de muitas doenças inflamatórias por migrarem para sítios inflamatórios e secretarem citocinas como TNF (Passlick, Flieger *et al.*, 1989). O TNF pode mediar a patogênese da LC

através de vários mecanismos entre eles a indução de óxido nítrico, apoptose, aumento de citotoxicidade e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Baugh e Bucala, 2001; Gupta, 2002; Lehmann, Edgar *et al.*, 2005).

As MMPs são enzimas dependentes de zinco que degradam proteínas da matriz extracelular, classificadas funcionalmente de acordo com as especificidades dos substratos que degradam. A MMP-9, também conhecida como gelatinase B, degrada desnaturado tipo I (gelatina) e colágeno tipo IV, um dos principais componentes da membrana basal (Nagase, Ogata *et al.*, 1991). Elas são secretadas como pró-enzimas, que são ativadas pela clivagem proteolítica e regulada por seus inibidores, os TIMPS (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase), que são produzidos constitutivamente por uma variedade de células (Murphy, Willenbronck *et al.*, 1994; Visse e Nagase, 2003). As MMPs são necessárias para o sucesso da erradicação da infecção por estimular a migração de células efectoras para o sítio inflamatório, porém, a inflamação excessiva acompanhada de infecção pode causar dano tecidual, estando elas envolvidas na causa dessa imunopatologia (Elkington, O'kane *et al.*, 2005). Estas enzimas são produzidas por muitos tipos celulares, incluindo linfócitos e granulócitos, mas em particular por macrófagos ativados (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993; Goetzl, Banda *et al.*, 1996). Várias citocinas presentes nos sítios inflamatórios influenciam na ativação de MMPs; TNF estimula a expressão e ativação de MMPs, IL-10 diminui e IFN- γ possui efeitos variados (Maretti-Mira, De Oliveira-Neto *et al.*, 2010). O infiltrado inflamatório nas lesões de pacientes com LC é detectado ainda nas fases iniciais do desenvolvimento da pápula e aumenta com a evolução da doença. Os fatores que induzem a ruptura da membrana basal levando ao desenvolvimento da úlcera ainda não são conhecidos. Recentemente, foi demonstrado que a infecção de macrófagos por *L. braziliensis* aumenta a expressão de MMP-9 nessas células (Maretti-

Mira, De Pinho Rodrigues *et al.*, 2011). Como MMP-9 degrada componentes da membrana basal, é de grande importância a identificação de células produtoras dessa enzima na infecção por *L. braziliensis*, bem como o papel de citocinas pró-inflamatórias na sua expressão.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

IV.1.1 Epidemiologia, Aspectos Clínicos e Imunológicos

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de flebotomos infectados com o parasita (Desjeux, 1996) e caracterizada pelo aparecimento de lesões ulcerativas que acometem a pele e as mucosas. A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente etiológico da LTA no Brasil, distribuído em diversas regiões do país (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985; Costa, Barrios *et al.*, 1986; Carvalho, Barral *et al.*, 1994; De Oliveira-Neto, Mattos *et al.*, 2000; Oliveira-Neto, Martins *et al.*, 2000; Turetz, Machado *et al.*, 2002).

A LTA possui ampla distribuição mundial estando presente em 88 países no Novo e Velho Mundo, com cerca de 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea anualmente. A doença é epidemiologicamente instável porque apresenta grandes flutuações e apesar da sua grande incidência, tem sido negligenciada como um problema de saúde pública. O aumento no número de casos está associado a fatores sócio-econômicos, políticos e ambientais e os danos estéticos, invalidez e estigma social e psicológico são todas, consequências graves da doença (OMS, 2007).

No Brasil, a LTA representa um importante problema de saúde pública com uma incidência anual estimada em cerca de 18.5 casos/100.000 habitantes. No período de 2006 a 2010, foram registrados cerca de 21.520 casos/ano, a região Norte apresentou o maior coeficiente de detecção (55,9 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (25,7 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (12,9 casos/100.000 habitantes) (Portal da Saúde, SUS, 2012). Na Bahia, o distrito de Corte de Pedra, localizado no sudeste do estado, é considerado uma das mais importantes áreas de transmissão de *L. braziliensis*, com alta prevalência de casos de LTA. Há mais de 25 anos pacientes têm sido

acompanhados nesta área endêmica e o aumento no número de casos tem sido observado. A detecção de casos novos aumentou de 200/ano, em 1985, para 1000/ano, em 2009. Nesta área endêmica, a doença é causada pela *L. braziliensis* e pode apresentar-se em quatro formas clínicas distintas: leishmaniose cutânea clássica (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose disseminada (LD) (Jirmanus, Glesby *et al.*, 2012).

Em pacientes com ausência de lesões na pele, a linfadenopatia pode ser o primeiro sinal da infecção por *L. braziliensis* (Barral, Barral-Netto *et al.*, 1992; Barral, Guerreiro *et al.*, 1995). Pacientes que apresentam linfadenopatia, pápula ou uma tênue exulceração são classificados com leishmaniose cutânea recente (LCR) (Machado, Araujo *et al.*, 2002; Unger, O'neal *et al.*, 2009). A forma LC é responsável por 90 a 95% dos casos de LTA, classicamente esta forma se caracteriza pela presença de uma ou mais lesões ulceradas de fundo granuloso e bordas elevadas (Llanos Cuentas, Cuba *et al.*, 1984). Pacientes com LC apresentam inicialmente uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação do parasito que aumenta gradativamente até formar uma úlcera crônica. Estas lesões apresentam poucos parasitos com tendência para a cura espontânea ou uma boa resposta ao tratamento (Da-Cruz, Bittar *et al.*, 2002). A resposta imune dos pacientes com LC caracteriza-se por altos níveis de citocinas Th1, como IL-2 e INF- γ , teste de Montenegro positivo e alta resposta linfoproliferativa (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985).

Cinco por cento dos indivíduos com leishmaniose cutânea podem desenvolver a forma mucocutânea, devido à habilidade dos parasitas persistirem nas lesões cicatrizadas após a cura clínica. Esta forma da doença acomete preferencialmente a mucosa nasal, mas pode comprometer também o palato, a faringe e a laringe (Barral-Netto, Barral *et al.*, 1995), o que pode favorecer o aparecimento de problemas respiratórios e infecções bacterianas secundárias. As lesões de LM, ao contrário das lesões de LC, não apresentam cura espontânea (Murray, Berman *et al.*, 2005). A LM é uma das formas mais agressivas da LTA, e resulta de uma exacerbada e não modulada resposta

imune Th1 (Carvalho, Passos *et al.*, 2007). Os pacientes com LM representam o polo hiperérgico da doença, com altos níveis de INF- γ e TNF, resposta linfoproliferativa e maior reatividade ao teste de Montenegro do que os encontrados em pacientes com LC (Carvalho, Johnson *et al.*, 1985). Estes pacientes apresentam ainda uma redução da habilidade de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , para modular a resposta imune favorecendo uma resposta inflamatória exacerbada (Bacellar, Lessa *et al.*, 2002).

A LD é uma forma emergente de leishmaniose correspondendo a cerca de 2% dos casos de infecção por *L. braziliensis* e resulta da disseminação do parasita por via hematogênica. Caracteriza-se clinicamente pela presença de múltiplas lesões papulosas e acneiformes, raramente com ulcerações e com frequente comprometimento mucoso. Inicialmente à infecção, os pacientes apresentam uma lesão, seguida de um relato de febre com aparecimento de múltiplas lesões por todo corpo. Nesta forma da doença, ocorre uma diminuição da resposta imune celular, com menor produção de INF- γ e TNF, favorecendo a multiplicação do parasito e disseminação da doença. Pacientes com LD podem apresentar o teste de Montenegro positivo ou negativo e baixa resposta linfoproliferativa (Carvalho, Barral *et al.*, 1994).

IV.1.2 Imunopatogênese da Leishmaniose

As apresentações clínicas da LTA são influenciadas por características, do parasita, do vetor e do hospedeiro e fatores genéticos do parasita e do hospedeiro (Barral-Netto, Brodskyn *et al.*, 1998; Schriefer, Schriefer *et al.*, 2004; Castellano, Filho *et al.*, 2009). Em todas as formas clínicas a susceptibilidade ou resistência à doença são dependentes de uma resposta mediada por linfócitos (TCD4⁺ e TCD8⁺) (Scott, Natovitz *et al.*, 1988), os quais atuam como fonte produtora de citocinas importantes para a ativação de monócitos e macrófagos, TNF e INF- γ (Pirmez, Yamamura *et al.*, 1993; Da-Cruz, Bittar *et al.*, 2002). Um bom prognóstico para a doença está relacionado a uma predominância de resposta Th1, uma vez que a produção de INF- γ é necessária para a ativação de macrófagos e síntese de derivados de oxigênio,

como óxido nítrico (ON) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), importantes para o controle da infecção. Enquanto a predominância de resposta Th2, com alta produção de IL-10, está relacionada à multiplicação do parasita (Scott, Natovitz *et al.*, 1988; Scott, Pearce *et al.*, 1989; Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998). (1-3) Este paradigma Th1/Th2 relacionado à resistência ou susceptibilidade à infecção foi descrito por Mossman & Coffman, em 1989, (Mosmann e Coffman, 1989) e na LTA pode estar influenciado por padrões de citocinas presentes durante os primeiros estágios de sobrevivência da leishmania dentro do macrófago (Barral-Netto, Brodskyn *et al.*, 1998). IL-12 é uma importante citocina responsável por direcionar a diferenciação de linfócitos para o perfil Th1. Esta citocina é primariamente produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs) (macrófagos e células dendríticas) em resposta a patógenos intracelulares e a sua secreção estimula a produção de IFN- γ por células Th1 e células NK. As células NK representam a primeira linha de defesa da resposta imune do hospedeiro após a invasão do parasita, atuando como principal fonte de IFN- γ no início da infecção (Gorak, Engwerda *et al.*, 1998). As células dendríticas também desempenham um papel importante na resistência à infecção por *Leishmania* através da apresentação de antígenos, ativação de células TCD4+ e estimulação de IL-12 (Lemos, Esquivel *et al.*, 2004).

Outra citocina importante que influencia o tipo de resposta do hospedeiro à infecção por *Leishmania* é a IL-10. Esta citocina facilita o crescimento do parasita e isso pode desempenhar um papel importante na fase inicial da infecção, contribuindo para o estabelecimento do parasita (Carvalho, Passos *et al.*, 2012). Em pacientes com leishmaniose visceral esta citocina atua regulando negativamente a resposta imune Th1, diminuindo a proliferação de linfócitos e a produção de IFN- γ (Carvalho, Bacellar *et al.*, 1994). Enquanto que em pacientes com leishmaniose mucosa a baixa produção de IL-10 favorece uma resposta imune exacerbada (Bacellar, Lessa *et al.*, 2002).

Nas fases iniciais da infecção por *Leishmania* citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF, são responsáveis pelo controle da multiplicação do parasito (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Follador, Araujo *et al.*, 2002), no

entanto estas citocinas contribuem para o dano tecidual observado na LC (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998). Antonelli, em 2005, observou uma correlação positiva entre a alta frequência de IFN- γ e TNF com o tamanho da lesão assim como o aparecimento de formas mais graves da LTA (4). A expressão elevada de TNF e do seu receptor são encontradas em lesões de pacientes com LC (Faria, Souza *et al.*, 2009), indicando seu papel na destruição tecidual.

IV.2 Participação dos monócitos/macrófagos nas doenças inflamatórias e na leishmaniose

Na infecção por *L. braziliensis* TNF é produzida principalmente por macrófagos, células responsáveis pela internalização e destruição do parasita. O envolvimento dos monócitos na leishmaniose tem sido investigado. Pacientes com LC apresentam frequência elevada de monócitos CD16+ com uma correlação positiva com o tamanho da lesão (Antonelli, Dutra *et al.*, 2005) e em pacientes com LC há uma correlação positiva entre o número de monócitos produzindo TNF e IL-10, enquanto que em pacientes com LM essa correlação não é observada (Gaze, Dutra *et al.*, 2006). Distintas subpopulações de monócitos são identificadas no sangue periférico de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD14 e CD16. O CD14 é um co-receptor do TLR-4 (Toll-like receptor 4), que é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas e o CD16 é o receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G (Fc γ RIII) (Ziegler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010).

Passlick em 1989, caracterizou os monócitos em duas sub-populações, os clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), representando cerca de 90-95% dos monócitos de um indivíduo sadio e os não-clássicos (CD14⁺CD16⁺), representando cerca de 5-10% (Passlick, Flieger *et al.*, 1989). Como estas sub-populações apresentavam padrões diferentes na produção de citocinas, sendo mais ou menos inflamatórias, os monócitos não-clássicos foram denominados como monócitos pró-inflamatórios. Em 2010, uma nova classificação dos monócitos foi proposta por Ziegler-Heitbrock *et al.*, a partir da alta ou baixa expressão de

CD14 e CD16: monócitos clássicos apresentando alta expressão de CD14, mas não de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻), os monócitos intermediários apresentando uma alta expressão de CD14 e baixa expressão de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺) e os monócitos não-clássicos apresentando baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD16 (CD14⁺CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010).

A análise de expressão gênica mostrou que estas sub-populações de monócitos apresentam distintas funções, sendo os monócitos intermediários e não-clássicos intimamente relacionados, enquanto monócitos clássicos e não-clássicos são distintos. Os monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) atuam como primeira linha de defesa da resposta imune inata contra patógenos intracelulares devido a sua alta capacidade fagocítica e alta expressão de proteínas antimicrobicas. Enquanto os monócitos intermediários apresentaram maior predisposição para a apresentação de antígenos devido à expressão de genes que codificam moléculas de MHC II e genes envolvidos no processamento de antígenos e quebra de proteínas (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011). Os monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) são os mais maduros, por apresentarem maior expressão de CD16, molécula altamente expressa em macrófagos, além de produzirem mais citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células para os sítios inflamatórios (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Ziegler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010). Os monócitos CD16⁺ têm sido associados a doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, diabetes e arteriosclerose (Ziegler-Heitbrock, 2007), além de produzirem altos níveis de TNF quando estimulados com LPS (Belge, Dayyani *et al.*, 2002). Em modelo murino de infecção por *L. major*, monócitos inflamatórios (Gr1⁺) foram capazes de migrar rapidamente para os sítios de infecção e produzir grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, eliminando quase todos os parasitas (Gonçalves, Zhang *et al.*, 2011). Monócitos são fagócitos da linhagem mielóide envolvidos na resposta inata à infecção bacteriana, fúngica, parasitária, e viral (Gupta, Mahanty *et al.*, 2001; Stroher, West *et al.*, 2001; Serbina, Jia *et al.*, 2008; Barbalat, Lau *et al.*, 2009), conhecidos por migrarem para os tecidos e se diferenciarem em macrófagos e células dendríticas (Ziegler-Heitbrock, Ancuta

et al., 2010). A migração de monócitos para o tecido requer a degradação da membrana basal e da matriz extracelular (Adams e Lloyd, 1997; Nagase, 1997; Sellebjerg e Sorensen, 2003; Visse e Nagase, 2003).

IV.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

A matriz extracelular (MEC) é constituída por um conjunto de proteínas e polissacarídeos, secretados por vários tipos celulares, que se organizam em redes e preenchem os espaços extracelulares dando suporte as células para a formação dos tecidos. A ligação entre esse complexo de moléculas e receptores de superfície contribui para a migração, proliferação, diferenciação e apoptose celular. A homeostase da MEC pode ser alterada durante processos infecciosos por citocinas, como TNF, IFN- γ e TGF- β , e Metaloproteínas de Matriz (MMPs), que são secretadas por extravasamento celular ou células do tecido ativadas (Sorokin, 2010).

As Metaloproteínas de Matriz (MMPs) são uma família de enzimas dependes de zinco, capazes de degradar componentes da MEC. Estas enzimas participam de diversos processos fisiológicos como morfogênese, desenvolvimento e reparo de tecidos (Murphy e Nagase, 2008). A primeira metaloproteína identificada (MMP-1) foi descoberta por Gross e Lapiere, que observaram atividade colagenolítica na cauda de girinos em metamorfose (Gross e Lapiere, 1962). Desde então, 25 MMPs foram identificadas, sendo 22 homólogas em humanos (Sternlicht e Werb, 2001). De acordo com as especificidades dos substratos que degradam estas enzimas são classificadas funcionalmente em: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs tipo-membrana (MT-MMPs) e outras (Nagase, Ogata *et al.*, 1991; Murphy e Nagase, 2008). As gelatinases, MMP-2 e MMP-9, degradam colágeno tipo I desnaturado (gelatina) e colágeno IV (Elkington, O'kane *et al.*, 2005), um dos principais componentes da membrana basal.

A atividade das MMPs é extremamente regulada, pois sua ação descontrolada pode causar dano tecidual. Em uma primeira etapa, como estas

enzimas raramente são armazenadas, a sua secreção requer um aumento da transcrição gênica, com as exceções de MMP-8 e -9 que podem ser imediatamente liberadas. Secundariamente, as MMPs são secretadas ainda inativas(Elkington, O'kane *et al.*, 2005), na forma de pró-enzima. MMP-9 é secretada como pró-enzima com peso molecular de 92kDa e sua latência é mantida por um pró-domínio conservado de cisteína, que cobre o sítio catalítico zinco-dependente. Através da clivagem proteolítica, onde o resíduo de cisteína é liberado expondo o sítio catalítico, a enzima torna-se ativa (MMP-9 ativa-82kDa) e disponível para clivagem de substratos (5). Após a secreção das MMPs na forma inativa, seus inibidores que podem ser específicos ou não, controlam a sua atividade. As α -macroglobulinas são inibidores gerais de MMPs encontradas no sangue e nos fluidos dos tecidos. Porém, são os TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) os principais inibidores das MMPs. Estes inibem especificamente as formas ativas da enzima ligando-se ao seu sítio catalítico, bloqueando sua atividade, e atuam preferencialmente nos tecidos onde são produzidos constitutivamente por uma variedade de células. A regulação da atividade da MMP-9 é realizada preferencialmente pelo TIMP-1 (Nagase, Ogata *et al.*, 1991; Murphy, Willenbrock *et al.*, 1994; Visse e Nagase, 2003).

As MMPs são produzidas por muitos tipos celulares, incluindo linfócitos e granulócitos, mas em particular por macrófagos ativados (Birkedal-Hansen, Moore *et al.*, 1993; Goetzl, Banda *et al.*, 1996). A expressão de MMP-9 por células imunes como monócitos, células dendríticas, linfócitos e neutrófilos, requer uma ativação adequada (Opdenakker, Van Den Steen *et al.*, 2001). Citocinas como TNF, TGF- β (Maretti-Mira, De Oliveira-Neto *et al.*, 2010; Costa, Nogueira De Melo *et al.*, 2008) e IL-1(Costa, Nogueira De Melo *et al.*, 2008) são conhecidas por estimularem a expressão e ativação das MMPs, enquanto que IL-10 diminui a expressão e ativação e IFN- γ possui efeitos variados (Maretti-Mira, De Oliveira-Neto *et al.*, 2010). A produção de MMP-9 por monócitos não é espontânea e ocorre simultaneamente à produção de TIMP, sendo a razão entre os níveis da enzima e do seu inibidor capaz de definir se a

MMP-9 está ativa após a remoção do pró-domínio (Opdenakker, Van Den Steen *et al.*, 2001). Um desequilíbrio entre a produção de MMPs e seus inibidores TIMPs pode levar a degradação excessiva da matriz com conseqüente destruição tecidual (Murphy e Nagase, 2008), sendo a disseminação ou persistência do patógeno decorrentes da quebra das barreiras dos tecidos e da criação de sítios imuno-privilegiados que são mal acessados por células imune do hospedeiro (Elkington, O'kane *et al.*, 2005).

A atividade descontrolada de MMP-9 tem sido associada a diversas condições patológicas. Como MMP-9 degrada o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal, sua ativação excessiva causa danos teciduais por facilitar a migração de células inflamatórias do hospedeiro e a disseminação do patógeno (Murphy e Nagase, 2008) (6). Além disso, ao degradar a membrana fragmentos de colágenos são liberados e estes por sua vez promovem estímulo contínuo para a inflamação dos tecidos (Sorokin, 2010). Em astrócitos de camundongos cultivados, TNF, IL-1 β e LPS foram potentes indutores de MMP-2 e MMP-9, sugerindo que a presença desta enzima no sistema nervoso central inflamado pode estar associada à patogênese ou progressão de doenças neurodegenerativas que possuam um componente inflamatório (Gottschall e Deb, 1996).

Na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, MMP-9 foi expressa por monócitos e esteve presente no infiltrado celular, próximo às áreas de necrose caseosa (Price, Gilman *et al.*, 2003). Em úlceras não cicatrizadas de diferentes etiologias, MMP-9 foi produzida por células do infiltrado inflamatório, localizadas no estroma (Mirastschijski, Impola *et al.*, 2002). Na hanseníase, lesões tuberculóides foram associadas com altos níveis de TNF, IFN- γ e mRNA de MMP-2 e MMP-9, e intensa atividade gelatinolítica (Teles, Teles *et al.*, 2010). Essas evidências reforçam a hipótese de que esta enzima participa de processos inflamatórios e a sua secreção excessiva contribui para a destruição dos tecidos.

A participação de MMP-9 no desenvolvimento da lesão tecidual na leishmaniose ainda não está esclarecida. Em modelos murinos, macrófagos infectados com *Leishmania chagasi* secretaram MMP-9 que contribuiu para lesão no fígado e níveis elevados de TNF resultaram em aumento da síntese desta enzima (Costa, Nogueira De Melo *et al.*, 2008). Em lesões de pacientes que não responderam bem ao tratamento com Glucantime foi observado um maior número de células produtoras de IFN- γ e níveis mais altos de atividade gelatinolítica. A detecção de gelatinase ativa em áreas necróticas, leito de feridas e infiltrado inflamatório sugeriu a participação de MMP-2 e MMP-9 nos danos teciduais da LC (Maretti-Mira, De Oliveira-Neto *et al.*, 2010). *In vitro*, macrófagos de pacientes com história prévia de LM quando infectados com *L. braziliensis* produziram mais MMP-9 quando comparados aos macrófagos de pacientes com história prévia de LC (Maretti-Mira, De Pinho Rodrigues *et al.*, 2011). Dessa maneira, acredita-se que a ação da MMP-9 está relacionada com o desenvolvimento da lesão tecidual na leishmaniose devido aos altos níveis de TNF na lesão.

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1 ÁREA DO ESTUDO

Corte de Pedra é um vilarejo pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, localizado no Sudeste do estado da Bahia, há 280 km de Salvador, possui um posto de saúde, que é referência para o diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), atendendo a população local e municípios vizinhos. A cada duas semanas, uma equipe de médicos e pesquisadores vinculados ao Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos (C-HUPES), visita esta região e presta assistência aos indivíduos acometidos por esta doença, sendo nesta ocasião selecionados os casos que participarão deste projeto de pesquisa. Além disso, agentes de saúde, residentes na área endêmica, são treinados para visitar famílias e recrutar pacientes para realização de pesquisas e acompanhamento clínico. Anualmente, cerca de 1000 pacientes são atendidos no Posto de Saúde de Corte de Pedra, sendo 80% (N=800) com leishmaniose cutânea, 13% (N=130) leishmaniose mucosa, 4% (N=40) com leishmaniose disseminada e 3% (N=30) com leishmaniose cutânea recente.

V.2 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo é um corte transversal com pacientes residentes na área endêmica de Corte de Pedra e com indivíduos sadios não residentes nesta área. A amostra foi composta por 19 indivíduos sadios, 19 pacientes com LCR e 59 pacientes com LC.

V.3 DEFINIÇÕES DOS CASOS

V.3.1 Leishmaniose Cutânea Recente (LCR)

Esta forma clínica da leishmaniose caracteriza-se pela presença de linfadenopatia ou linfadenopatia acompanhada de pápula ou lesão exoulcerativa, sem lesão definida com bordas elevadas com presença de

infiltrado inflamatório. O diagnóstico é definido pela identificação do parasita após a punção do linfonodo, biópsia de lesão ou quadro típico de leishmaniose cutânea recente acompanhada ao teste de hipersensibilidade tardio positivo ao antígeno solúvel de *Leishmania* (Teste de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar.

V.3.2 Leishmaniose Cutânea (LC)

Esta forma clínica da leishmaniose caracteriza-se pela presença de lesão ulcerativa na pele, sem comprometimento da mucosa nasal. Sendo o diagnóstico definido pela identificação do parasita em cultura a partir do aspirado de lesão ou pela lesão típica característica de LC acompanhado ao teste de hipersensibilidade tardio positivo ao antígeno solúvel de *Leishmania* (Teste de Montenegro) e histopatologia compatível com Leishmaniose Tegumentar.

V.3.3 Controles Sadios

Este grupo é caracterizado por indivíduos sadios, não residentes na área endêmica de Corte de Pedra.

V.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica que apresentaram diagnóstico de leishmaniose baseados nos critérios de definições de casos descritos acima.

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos sadios de ambos os gêneros, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, não residentes na área endêmica e sem história prévia de leishmaniose.

V.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes com história prévia de LTA, mulheres grávidas e pacientes com outras doenças infecciosas ou com deficiência imunológica.

V.6 METODOLOGIA

V.6.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Os grupos controle e de pacientes foram submetidos à coleta de 20 ml de sangue venoso periférico. O sangue foi coletado em tubo Falcon estéril contendo heparina (1000U/ml). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através de gradiente de concentração com Ficoll-Paque™ Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durhman, NC, USA). Após centrifugação a 1450 rpm durante 30 minutos a 25° C, um anel de CMSP foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma. Em seguida, as CMSP foram centrifugadas duas vezes a 1290 rpm durante 10 minutos, com solução salina (0,9% de NaCl). As CMSP foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado.

V.6.2 Marcação de superfície celular para FACS

As CMSP foram ressuspensas em solução salina e ajustadas para a concentração $0,5 \times 10^6$ células/ml, colocadas em tubos de poliestireno de 5 ml. Foi realizada a marcação de superfície celular *ex-vivo* utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD14 – APC (BD Phamingen™) e anti-CD16 – PE (BD Phamingen™), após a adição dos anticorpos diluídos na concentração 1:10 os tubos foram deixados a 4°C, protegidos da luz, por 15 minutos. Em seguida, as CMSP foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl) e fixadas com paraformaldeído a 2%.

V.6.3 Marcação intracelular para FACS

As CMSP marcadas com anticorpos anti-CD14 - APC e anti-CD16 - PE foram lavadas com solução salina (0,9% de NaCl) e ressuspensas em BD Perm/Wash 1x por 15 minutos, para a marcação intracelular. Após este período, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-MMP-9 – FITC (BD Phamingen™), diluído na concentração 1:10, por 30 minutos e protegidas da luz a 4°C. Em seguida, as CMSP foram lavadas com BD Perm/Wash 1x e ressuspensas em solução salina (0,9% de NaCl). Imediatamente à marcação foram realizadas as leituras destas células utilizando o FACS Canto II.

V.6.4 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

CMSP foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, Invitrogen™ América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de streptamicina e ajustadas para concentração 3×10^6 células/ml, colocadas em placas com 24 poços. Cultura por 72 horas foi realizada na presença ou ausência de SLA (5ug/ml). Culturas por 24 horas foram realizadas na presença ou ausência de TNF recombinante (5ng/ml) ou anticorpo anti-TNF (10ug/ml).

V.6.5 Cultura de células de biópsias

As biópsias de pacientes com LC foram extraídas do bordo da lesão, utilizando um punch de 5mm e colocadas inteiras, sem nenhum procedimento de maceração, em tubos estéreis com 1ml de RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, Invitrogen™ América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de streptamicina. A cultura foi realizada por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂.

V.6.6 Dosagem dos níveis de MMP-9, TIMP-1 e TNF

Os níveis de MMP-9, TIMP-1 e TNF foram determinados nos sobrenadantes de cultura de CMSP pela técnica de ELISA. Para as dosagens de MMP-9 e TIMP-1 foram utilizados Kits da R&D Systems (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante, descrito brevemente a seguir. As placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-MMP-9 ou anti-TIMP-1 e incubadas overnight em temperatura ambiente. Após incubação as placas foram bloqueadas com Reagente Diluente (1% BSA em PBS pH 7.4) em temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio os sobrenadantes (100ul/poço) foram adicionados à placa e incubados em temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se Streptavidina por 20 minutos em temperatura ambiente. Entre cada etapa foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (Tween 0,05% em PBS pH 7.4). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os resultados foram expressos em pg/ml.

Para a dosagem de TNF foi utilizado KIT da BD Biosciences (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), utilizando o protocolo recomendado, descrito brevemente a seguir. As placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-TNF incubadas overnight à 8°C. Após incubação as placas foram lavadas bloqueadas com Reagente Diluente (10% de Soro Bovino Fetal em PBS pH 7.4) em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio os sobrenadantes (100ul/poço) foram adicionados à placa e incubados em temperatura ambiente por duas horas. As placas foram incubadas com anticorpo de detecção mais Streptavidina em temperatura ambiente por uma hora. Entre cada etapa foram realizadas cinco lavagens com tampão de lavagem (Tween 0,05% em PBS pH 7.4). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os resultados foram expressos em pg/ml.

V.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de citometria de fluxo foram analisados através do software *Flowjo* versão 7.6.5. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). Segundo o teste da normalidade de D'Agostino-Pearson os dados apresentaram distribuição não-paramétrica. Comparações entre duas variáveis contínuas independentes foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney, para as variáveis contínuas dependentes foi utilizado o teste *U* de Wilcoxon. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram utilizados para a comparação de três variáveis contínuas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de *p* foi menor que 0.05.

V.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (protocolo – 10/10). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a confidencialidade dos dados foi preservada de acordo com o disposto da Resolução 196/96 do CONEP. Este estudo foi financiado pelo NHI através do grant ICIDR AI088650-01.

VI. ARTIGO 1

“Monocyte Production of Matrix Metalloproteinase 9 in patients with Cutaneous Leishmaniasis”. Revista The Journal of Immunology (artigo a ser submetido, vide Normas de Publicação no ANEXO V).

Monocyte Production of Matrix Metalloproteinase 9 in patients with Cutaneous Leishmaniasis

Taís M. Campos¹; Sara Passos, ^{1,2}; Rúbia S. Costa,¹; Adriano Queiroz, ¹; David Mosser³; Phillip Scott⁴; Edgar M. Carvalho^{1,2} and Lucas P. Carvalho^{1,2}

⁽¹⁾Serviço de Imunologia / UFBA - Brazil

⁽²⁾INCT-DT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia – Doenças Tropicais) - Brazil

⁽³⁾ Department of Cell Biology and Molecular Genetics – University of Maryland, College Park - USA

⁽⁴⁾ Department of Pathobiology, University of Pennsylvania, Philadelphia – USA

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by the presence of one or more ulcerated lesions of raised borders. Cells TCD4+ and TCD8+ serve as source producing cytokines that activate macrophages to destroy the parasites. Circulating monocytes are a heterogeneous population subdivided into classical monocytes (CD14++CD16-), intermediate monocytes (CD14+CD16+) and non-classical monocytes (CD14+CD16++), and are known to migrate to inflammatory sites and secrete cytokines. TNF can mediate the pathology of CL through induction of nitric oxide, increased cytotoxicity and expression of matrix metalloproteinases (MMPs). MMP-9 is a zinc-dependent enzyme which degrades type IV collagen, a component of basal membrane, and is controlled by TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1). The infection of macrophages by *L. braziliensis* increases the expression of MMP-9, suggesting that MMP-9 contributes to tissue injury in the CL. We observed that monocytes were major cells producing MMP-9 and all three subsets of monocytes from patients with early CL and CL more expressed MMP-9, compared with those in healthy individuals. In patients with CL non-classical monocytes producer was the main source of MMP-9. Elevated levels of MMP-9 and lower levels of TIMP-1 were found in culture supernatants from PBMC of patients with cutaneous leishmaniasis. Our datas suggest that high levels of TNF in patients with cutaneous leishmaniasis contribute to MMP-9 production by monocytes.

INTRODUCTION

Leishmania braziliensis is the main etiological agent of cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil, and the District of Corte de Pedra, located in the southeast of Bahia, one of the most important areas of transmission of *L. braziliensis* in the country with high prevalence of cases of CL (7). CL caused by infection with *L. braziliensis* is characterized by the presence of one or more

ulcerated granulomatous lesions of raised borders (8). After infection, most patients develop lymphadenopathy, followed by the appearance of a papule at the bite site which subsequently, becomes an ulcerated lesion. These lesions are characterized by a robust inflammatory infiltrate including the presence of T and B lymphocytes, macrophages, Langerhans cells and plasma cells (9, 10). High levels of proinflammatory cytokines such as TNF are detected in biopsies of patients with CL. This cytokine contributes to the destruction of *Leishmania*, but induces tissue damage, thereby, contributing to disease pathogenesis (3, 11-13).

In CL CD4⁺ and CD8⁺ T cells act as a source of proinflammatory cytokines that activate monocytes and macrophages (14). Monocytes constitute a heterogeneous population with different subsets, which have specific functions and phenotypes (15). According to expression of CD14 and CD16, these cells are subdivided into classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁺⁺CD16⁺) monocytes (16). It has been documented that CD16⁺ expressing monocytes (non-classical and intermediates) have been associated with the pathogenesis of many inflammatory diseases by migrate to the site of infections and secrete cytokines such as TNF (17). TNF participates in the pathogenesis of CL through the induction of nitric oxide production, apoptosis and increasing cytotoxicity and expression of matrix metalloproteinases (MMPs) (18-20).

MMPs are zinc-dependent enzymes that degrade extracellular matrix proteins, functionally classified according to the specificities of the substrates they degrade (5, 21). MMP-9, also known as gelatinase B, degrades denatured type I (gelatin) and type IV collagen, a major component of basal membrane (22). They are secreted as proenzymes, which are activated by proteolytic cleavage and regulated by their inhibitors, the Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs) which is constitutively produced by a variety of cells (23). MMPs are produced by many cell types including lymphocytes and granulocytes, but in particular by activated macrophages (24). Cytokines such as TNF, TGF- β (25, 26) and IL-1 (26) are known to stimulate the expression and activation of MMPs, whereas IL-10 decreases the expression and activation, and

IL -1 β (27, 28) and IFN- γ (25) have varying effects. MMPs are necessary for successful eradication of infection by stimulating the migration of effector cells to the inflammatory site, but excessive inflammation accompanied by infection can cause tissue damage, as they were involved in this cause immunopathology (29). The inflammatory infiltrate in the lesions of patients with CL is still detected in the early stages of development wheal and increases with disease progression. The factors that induce the breakdown of the basal membrane leading to the development of ulcer are not yet known. Since the macrophage infection by *L. braziliensis* increases the expression of MMP-9 in these cells (30) and monocytes which are known to migrate into the tissue and differentiate into macrophages, our aim was to investigate the contribution of sub-populations of monocytes to produce MMP-9 in cutaneous leishmaniasis.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Participants of this study include 78 CL patients from Corte de Pedra, Bahia state, Brazil, an endemic area *L. braziliensis*, transmission and 19 healthy subjects not living in endemic area agreed to provide a blood sample (20 ml). This work was approved by the Ethics and Research Comitee at Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos. Nineteen patients with lymphadenopathy or lymphadenopathy accompanied by exoulcenerative papule or injury without definite lesion with raised borders with inflammatory infiltration, were classified as early cutaneous leishmaniasis (ECL group) and fifty-nine patients with skin lesion with raised borders and granular base without compromising the nasal mucosa were classified as cutaneous leishmaniasis (CL group).

Separation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. After washing three times in 0.9% NaCl, the PBMC were resuspended and counted in Newbauer

camera, adjusting the concentration of interest in accordance with each assay performed. Because the cell numbers from the patients were insufficient to perform all experiments, unequal numbers of patients were analyzed for each set of experiment.

Cell surface staining for FACS

The PBMC were resuspended in saline and adjusted to a concentration of $0,5 \times 10^6$ cells / ml. Marking was performed ex-vivo cell surface using the monoclonal anti-CD14 - APC (BD Phamingen™) and anti-CD16 - PE (BD Phamingen™) after addition of antibody concentration diluted in 1:10 tubes were left 4 ° C, protected from light, for 15 minutes. Then, PBMC were washed with saline (0.9% NaCl) and fixed with 2% paraformoldehide.

Intracellular staining for FACS

PBMC labeled with anti-CD14 - CD16 APC and anti - PE were washed with saline (0.9% NaCl) and resuspended in BD Perm / Wash 1x for 15 minutes for intracellular labeling. After this period, cells were washed and stained with monoclonal anti-MMP-9 - FITC (BD Phamingen™) diluted 1:10 in concentration by 30 minutes, protected from light at 4 ° C. Then, PBMC were washed with BD Perm / Wash 1x and resuspended in saline (0.9% NaCl). These experiments were done using the FACS Canto II.

Culture of peripheral blood mononuclear cells

PBMC were resuspended in 1 ml of culture medium RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS 12,657 Gibco Laboratories, South America Invitrogen™), 10 IU / ml penicillin and 100µg/ml streptamicina and the concentration adjusted to 3×10^6 cells / ml, placed on plates with 24 wells. Culture was performed for 72 hours in the presence or absence of SLA (5ug/ml). Cultures were carried out for 24 hours in the presence or absence of recombinant TNF (5ng/ml) or anti-TNF antibody (10ug/ml). Supernatants were collected and stored at - 70° C. The

levels of MMP-9, TIMP-1 and TNF were measured by the ELISA method using commercial reagents (R&D Systems, Minneapolis, MN) for MMP-9 and TIMP-1 and (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for TNF. The results are expressed in pg/ml.

Cell cultures from biopsies

The biopsies of patients with LC were taken from the lesion edge, using a 5mm punch and placed whole, without maceration procedure, tubes with 1 ml of RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS 12,657 Gibco Laboratories, South America InvitrogenTM), 10 IU / ml penicillin and 100µg/ml of streptomycin. The culture was performed for 12 hours at 37° C and 5% CO₂. Supernatants were collected and stored at – 70° C. The levels of MMP-9 were measured by the ELISA method using commercial reagents (R&D Systems, Minneapolis, MN) and the results are expressed in pg/ml.

Statistical analysis

The flow cytometric data were analyzed using the FlowJo software version 7.6.5. Prism 5.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) was used for statistical evaluation. Kruskal-Wallis test (nonparametric test) was used to compare the ECL, CL and HS groups; Wilcoxon matched pair test (paired and nonparametric *t* test) was used to analyze cultures PBMC in different conditions within the same group. Comparisons were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

MMP-9 is produced by monocytes in patients with cutaneous leishmaniasis

Considering that MMP-9 is an enzyme able of degrading the basal membrane and may contribute to the onset of injury to patients with cutaneous

leishmaniasis, we evaluated the cellular source of MMP-9 in these patients. We demonstrate that both TCD4+ and the TCD8+ lymphocytes produce MMP-9, however, the CD14+ cells are those that have greater frequency of cells producing MMP-9 in patients with cutaneous leishmaniasis (n= 4) (Fig.1). This experiment was performed in PBMC *ex-vivo* from patients with CL by flow cytometry and demonstrated that monocytes produce MMP-9 in infection by *L. braziliensis*.

Monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis expresses MMP-9

Recently three subsets monocytes were described based on the expression of CD14 and CD16 (Zeigler, 2010). Aiming to observe the frequency of MMP-9 in the three subsets of monocytes, we performed *ex - vivo* analysis of PBMC from patients with ECL (n=11), CL (n=28) and healthy subjects (n=17) cytometric flow. Figures 2A and B show the strategy for determining the area (gate) of monocytes and determination of expression of MMP-9 histogram for each subpopulation according to expression of CD14 and CD16. In Figures 2C and D found that monocytes from patients with ECL and CL express more MMP-9 than monocytes from healthy individuals (p=0.0001) and that non-classical monocytes (CD14+CD16++) are the major source of MMP-9 in patients with CL (p=0.0001).

Imbalance between the production of MMP-9 and TIMP-1 in patients with cutaneous leishmaniasis

An imbalance between MMPs/TIMPs ratios may cause excessive degradation of extracellular matrix and consequently tissue damage. To determine the balance between production levels of MMP-9 and its inhibitor TIMP-1, PBMC from patients with ECL (n =17), CL (n=18) and healthy subjects (n=12) were stimulated with soluble antigen of Leishmania (SLA) for 72 hours and levels of these enzymes were determined by ELISA. CL patients had high levels of MMP-9 (Fig. 3A) and low levels of TIMP-1 (Figure 3B) and

the MMP-9/TIMP-1 ratios indicated an imbalance in the production of these enzymes ($p < 0.0001$) 90 (fig 3C).

Lesions of patients with cutaneous leishmaniasis have high levels of MMP-9

MMPs are produced in peripheral blood by diverse cell types and after its secretion, they migrate into tissues, where they are capable of degrading the extracellular matrix facilitating the influx of cells to the inflammatory sites. Since we observed an imbalance between the levels of MMP-9 and its inhibitor TIMP-1 in peripheral blood of patients with CL, we decided to investigate whether these patients lesions production of MMP-9 would be increased. For this purpose, PBMC and cells from biopsies of patients with CL ($n=6$) were cultured for 12 hours and the levels of MMP-9 were determined by ELISA. We observed that lesions of patients with CL levels of MMP-9 are higher when compared to PBMC (Figure 4).

Patients with cutaneous leishmaniasis have high levels of TNF

The role of TNF in the pathology of CL has been linked to tissue damage and induction of MMPs one of the mechanisms used. Aiming to evaluate the production of cytokines in patients with CL ($n = 18$), PBMC were cultured in the presence or absence of SLA for 72 hours and their levels measured by ELISA. High levels of TNF have been observed in patients with CL (Figure 5).

TNF induces production of MMP-9

TNF is an inflammatory cytokine produced primarily by monocytes and tissue damage is associated with the infection by *L. braziliensis*, besides being considered the main inducer of MMP-9. In order to confirm the ability of TNF to induce the production of MMP-9, PBMC of healthy individuals ($n = 5$) were stimulated with recombinant TNF for 24 hours and production levels of MMP-9 were measured by ELISA. After 24 hours, we observed an increase in the

production of MMP-9 (Figure 6) confirming the ability to stimulate TNF secretion this enzyme.

Neutralization of TNF decreases MMP-9 production in patients with cutaneous leishmaniasis

In the aim of verify the production of MMP-9 in patients with CL was associated with TNF, PBMC from CL patients (n = 7) were cultured in the presence or absence of anti-TNF and MMP-9 levels were determined by ELISA. After blocking of TNF was observed a decrease in the levels of MMP-9 (p = 0.0156) (Figure 7).

DISCUSSION

MMPs have a critical role in physiological processes such as cell migration, angiogenesis and extracellular matrix remodeling. However, uncontrolled high expression and secretion of these enzymes have been associated with pathological processes (6), the macrophage migration dependent on MMP-9 (31). Since the macrophage infection by *L. braziliensis* increases the expression of MMP-9 in these cells (30) investigated the contribution of sub-populations of monocytes for the production of MMP-9 in cutaneous leishmaniasis. And we observed that patients with ECL and CL expressing more MMP-9 than healthy subjects, being the sub-population of non-classical monocytes the primary production source of MMP-9 in CL and a major inducer of this TNF production.

During the infectious process, monocytes are recruited to sites of inflammation and produce soluble factors to examples of cytokines, chemokines, and enzymes in response to pathogens (15, 16). In leishmaniasis, macrophages are the main reservoirs of the parasite, is responsible for infection control (32). Because monocytes are macrophage precursor cells, we investigated the production of MMP-9 by these cells. And we found that monocytes are the main cells producing MMP-9 in patients with CL compared to CD4 + and CD8 + lymphocytes (Figure 1). This finding was also shown in other infectious diseases

like malaria (27) and TB (33), in which MMP-9 is produced predominantly by activated monocytes. As migration of monocytes into the tissue requires the degradation of the basement membrane and extracellular matrix (5, 23, 34), the production of MMP-9 is essential for monocyte migration of these cells to inflammatory sites.

Monocytes have three sub-populations according to the expression of CD14 and CD16 (Fig. 2A and 2B), and each sub-population have distinct roles during the infectious process. The classical monocytes (CD14 ++ CD16-) have a high phagocytic capacity and express more anti-microbicidal proteins, acting as a first line of defense of the innate immune response against intracellular pathogens. Meanwhile, the intermediate monocytes (CD14 ++ CD16 +) are responsible for the production of reactive oxygen and express more MHC-II act more effectively as antigen presenting cells than the other sub-populations of monocytes. And non-classical monocytes (CD14 + CD16 ++) are more mature, due to increased expression of CD16, and produce more pro-inflammatory cytokines responsible for the recruitment of cells to the inflammatory sites (15, 16). In this study, patients with the latest and classic cutaneous leishmaniasis showed a higher frequency of monocytes expressing MMP-9 in all sub-populations (classical, intermediate and non-classical) when compared to healthy individuals (Figure 2C). Furthermore, some patients with CL showed an increase in mean fluorescence intensity (MFI) of non-classical monocytes (Figure 2D), suggesting that this sub-population is responsible for the production of MMP-9 in these individuals. Soares et al. in 2006 (35), observed an increased frequency of MFI and CD16 + monocytes in patients with CL. The production of MMP-9 by non-classical monocytes can be explained by the fact that it presents a high expression of CD16 and low expression of CD14, and macrophages (36). It is possible that this is the main precursor sub-population of macrophages and to migrate into tissues these cells produce cytokines and enzymes, such as MMP-9, that participate in the inflammatory tissue. The excessive degradation of matrix in inflammatory diseases such as aortic aneurysm, has been ascribed to the

production of MMP-9 by monocytes (37). This is corroborated by the findings of our study, confirming the participation of monocytes to production of MMP-9.

After secreted MMP-9 is regulated by its extremely inhibitor TIMP-1, with a 1:1 ratio of the enzyme for its inhibitory indicative of inhibition of the activity of MMP-9 (38). We observed that in supernatants from PBMC patients with ECL and CL showed higher levels of MMP-9 (Fig. 3A) and lower levels of the inhibitor TIMP-1 (Figure 3B) compared to healthy individuals and patients with CL showed imbalance MMP-9/TIMP-1 between levels (Figure 3C). In patients with chronic pressure ulcers that fail to heal, the ratio MMP-9/TIMP-1 was greater than in patients whose ulcers healed, these data suggest that the proportion of levels can be MMP-9/TIMP-1 a predictor of healing, suggesting that elevated levels of MMPs and TIMPs low levels impair healing of these wounds (39). *In vitro*, macrophages from patients with a history of CL and ML showed imbalance between the levels of MMP-9 and TIMP-1, but no difference between the two groups (30). The loss of control over production of MMPs may result in pathological tissue degradation (6). Patients with the recent form of leishmaniasis have lower levels of MMP-9 than patients with the skin, it is possible that the ulcer development for papule to be due to increased levels of MMP-9 and MMP-resultant imbalance between MMP-9 and TIMP-1.

The high activity of MMP-9 did not contribute to the healing of chronic venous ulcers of lower limbs (40, 41). CL observed in patients with higher levels of MMP-9 in supernatants of PBMC when compared to biopsies (Figure 4). In a murine model of infection with *L. chagasi*, the production of MMP-9 by macrophages was associated with tissue damage (26). Maretti-Mira *et al* (25), in 2010, observed in lesions of CL patients who failed treatment, high number of cells producing IFN- γ and high levels of gelatinase activity . These data suggest that elevated levels of MMP-9 found in lesions of patients with CL may be associated with tissue damage.

The production of MMP-9 is not spontaneous, being dependent on the interaction of cell-cell and cell-matrix as well as the secretion of cytokines (23).

TNF is the main inducer of MMP-9 (24, 42) and its association with tissue damage in the ACL has been documented (4). In this study, we observed that patients with CL produce high levels of TNF when stimulated with SLA (Figure 5), as also found by other authors in the CL (3, 4). This cytokine is closely related to the levels of MMP-9 produced by monocytes in the patients. TNF is an important inflammatory cytokine involved in immune regulation and resistance to various microorganisms exert a variety of biological activities such as apoptosis, cytotoxicity and induction of metalloproteinases (18-20). We confirmed the ability to induce TNF secretion of MMP-9 by administration of recombinant TNF (rTNF) exogenous culture of PBMC of healthy individuals, which was accompanied by increased levels of MMP-9 (Figure 6), whereas neutralization of TNF by blocking antibody (anti-TNF) in cultures of PBMC from CL patients resulted in decreased levels of MMP-9 (figure 7). In other diseases was also observed association of TNF with MMP-9. For example, in *Falciparum malaria*, activation of MMP-9 was dependent production of TNF and canceled by anti-TNF (27). Another example of this combination was demonstrated in a murine model of aneurysm induction, being responsible for the failure of TNF down-regulation of MMP-2 and MMP-9, and consequent prevention of aneurysm formation (43).

As CL patients have elevated TNF levels and these are associated with tissue destruction, we believe that an important mechanism for the formation of TNF ulcer is the induction of MMP-9. Thus, excessive TNF stimulation for the production of MMP-9 would lead to an imbalance between production of this enzyme and its inhibitor, TIMP-1, with consequent excessive degradation of the basement membrane facilitating the migration of inflammatory cells to the site of inoculation parasite, favoring the appearance of the ulcer.

In conclusion, monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis produce MMP-9 in response to high levels of TNF, which may be contributing to the disruption of the basement membrane and the emergence of ulcer.

FIGURES LEGENDS

Figure 1.

Monocytes from patients with CL produce MMP-9. PBMC were obtained from patients with CL (n = 4) and labeling was performed *ex-vivo* for CD4, CD8, CD14 and MMP-9 and evaluated by flow cytometry. The results were analyzed using the FlowJo shown and frequency of cells producing MMP-9.

Figure 2.

Monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis express MMP-9. PBMC were obtained from patients with ECL (n = 11), CL (n = 28) and healthy subjects (n = 17), labeling was performed *ex-vivo* for CD14, CD16 and MMP-9 and evaluated by flow cytometry. (A) Strategy for determining the region (gate) defining monocytes and monocyte sub-populations from the expression of CD14 and CD16. (B) Frequency of MMP-9 in each sub-population of monocytes determined by histogram. (C) Frequency of MMP-9 in sub-populations of monocytes of patients with ECL, CL and healthy individuals. (D) Mean fluorescence intensity (MIF) of MMP-9 in sub-populations of monocytes of patients with ECL, CL and healthy individuals. Kruskal-Wallis test used to compare the means between the groups, post-test Dunn. Statistically significant at $p < 0.05$.

Figure 3.

Patients with cutaneous leishmaniasis have high levels of MMP-9 and low levels of TIMP-1 compared with healthy individuals. Levels of MMP-9 (Fig. 3A) and TIMP-1 (Figure 3B), by ELISA in culture supernatants of PBMCs in media or stimulated with soluble Leishmania antigen (SLA) (5ug/ml) for 72 hours patients with ECL (n = 17), CL (n = 18) and healthy subjects (n = 12). (Figure 3C) the ratio between MMP-9/TIMP-1 levels in culture supernatants of PBMCs in media or stimulated with soluble Leishmania antigen (SLA) (5ug/ml) for 72 hours from patients with ECL (n = 17), CL (n = 18) and healthy subjects (n = 12).

Figure 4.

Lesions of patients with CL higher levels of MMP-9 as compared to PBMC. The production of MMP-9 in PBMCs and biopsies of patients with CL (N = 6) was

determined by ELISA after the culture of cells for 12h. For the culture of biopsy used was a fragment of 5mm and for culturing 3×10^6 PBMC cells were used.

Figure 5.

CL patients have elevated levels of TNF. PBMC from CL patients (n = 18) were cultured in the presence or absence of SLA (5ug/ml) for 72 hours, and TNF levels were measured by ELISA.

Figure 6.

TNF induces production of MMP-9. PBMC from healthy subjects (n = 5) were cultured in the presence or absence of recombinant TNF (5ng/ml) for 24 hours and the levels of MMP-9 were determined by ELISA. Wilcoxon test for paired analysis, statistically significant at $p < 0.05$.

Figure 7.

Neutralization of TNF decreases MMP-9 production in patients with CL. CL PBMC (n = 7) were cultured in absence or presence (Figure B) anti-TNF antibody (10ug/ml) for 24 hours. The levels of MMP-9 were measured by ELISA. Analysis using the paired Wilcoxon test, statistical significance $p < 0.05$.

REFERENCES

1. Scott, P., P. Natovitz, R. L. Coffman, E. Pearce, and A. Sher. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 168:1675-1684.
2. Scott, P., E. Pearce, A. W. Cheever, R. L. Coffman, and A. Sher. 1989. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 112:161-182.
3. Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, H. Lessa, O. Bacellar, and E. M. Carvalho. 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31:143-148.
4. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. P. Almeida, O. Bacellar, E. M. Carvalho, and K. J. Gollob. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with

- lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101:226-230.
5. Visse, R., and H. Nagase. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.
 6. Murphy, G., and H. Nagase. 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 29:290-308.
 7. Jirmanus, L., M. J. Glesby, L. H. Guimaraes, E. Lago, M. E. Rosa, P. R. Machado, and E. M. Carvalho. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 86:426-433.
 8. Llanos Cuentas, E. A., C. C. Cuba, A. C. Barreto, and P. D. Marsden. 1984. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78:845-846.
 9. Pirmez, C., M. P. Oliveira-Neto, G. Grimaldi Junior, and W. Savino. 1990. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. Modulation of MHC class II gene products by keratinocytes before and after glucantime therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85:203-209.
 10. Da-Cruz, A. M., A. L. Bertho, M. P. Oliveira-Neto, and S. G. Coutinho. 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 153:537-543.
 11. Gomes-Silva, A., R. de Cassia Bittar, R. Dos Santos Nogueira, V. S. Amato, M. da Silva Mattos, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz. 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149:440-444.
 12. Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollob, and E. M. Carvalho. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70:6734-6740.
 13. Da-Cruz, A. M., R. Bittar, M. Mattos, M. P. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Ribeiro, R. B. Azeredo-Coutinho, and S. G. Coutinho. 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:251-256.
 14. Brelaz, M. C., A. P. de Oliveira, A. F. de Almeida, M. de Assis Souza, A. C. Medeiros, M. E. de Brito, and V. R. Pereira. *Leishmania* (Viannia)

braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol*.

15. Zawada, A. M., K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R. R. Marell, D. Fliser, and G. H. Heine. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118:e50-61.
16. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-80.
17. Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534.
18. Baugh, J. A., and R. Bucala. 2001. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4:635-650.
19. Gupta, S. 2002. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol* 22:185-194.
20. Lehmann, W., C. M. Edgar, K. Wang, T. J. Cho, G. L. Barnes, S. Kakar, D. T. Graves, J. M. Rueger, L. C. Gerstenfeld, and T. A. Einhorn. 2005. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 36:300-310.
21. Nagase, H., Y. Ogata, K. Suzuki, J. J. Enghild, and G. Salvesen. 1991. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans* 19:715-718.
22. Murphy, G., F. Willenbrock, T. Crabbe, M. O'Shea, R. Ward, S. Atkinson, J. O'Connell, and A. Docherty. 1994. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 732:31-41.
23. Nagase, H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378:151-160.
24. Ansari, N. A., G. K. Katara, V. Ramesh, and P. Salotra. 2008. Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 154:391-398.
25. Maretti-Mira, A. C., M. P. de Oliveira-Neto, A. M. Da-Cruz, M. P. de Oliveira, N. Craft, and C. Pirmez. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 163:207-214.

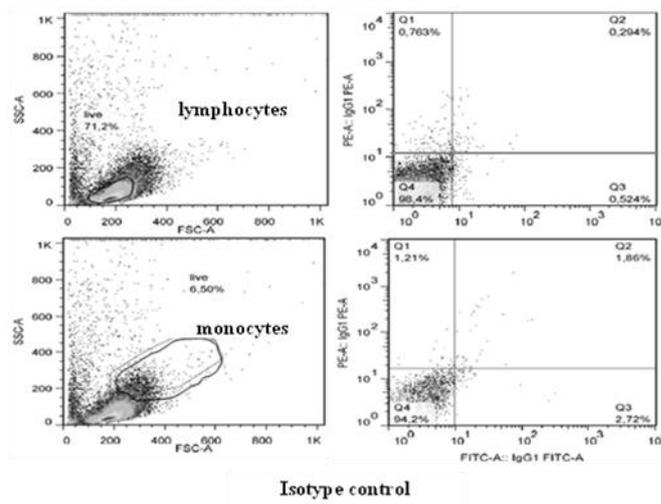
26. Costa, J. D., A. C. Nogueira de Melo, A. B. Vermelho, N. Meirelles Mde, and R. Porrozzì. 2008. In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Trop* 106:175-183.
27. Prato, M., G. Giribaldi, M. Polimeni, V. Gallo, and P. Arese. 2005. Phagocytosis of hemozoin enhances matrix metalloproteinase-9 activity and TNF-alpha production in human monocytes: role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of falciparum malaria. *J Immunol* 175:6436-6442.
28. Nee, L. E., T. McMorrow, E. Campbell, C. Slattery, and M. P. Ryan. 2004. TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 66:1376-1386.
29. Elkington, P. T., C. M. O'Kane, and J. S. Friedland. 2005. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 142:12-20.
30. Maretti-Mira, A. C., K. M. de Pinho Rodrigues, M. P. de Oliveira-Neto, C. Pirmez, and N. Craft. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 119:160-164.
31. Tomlinson, M. L., C. Garcia-Morales, M. Abu-Elmagd, and G. N. Wheeler. 2008. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. *Mech Dev* 125:1059-1070.
32. Rittig, M. G., and C. Bogdan. 2000. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16:292-297.
33. Price, N. M., R. H. Gilman, J. Uddin, S. Recavarren, and J. S. Friedland. 2003. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 171:5579-5586.
34. Sellebjerg, F., and T. L. Sorensen. 2003. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull* 61:347-355.
35. Soares, G., A. Barral, J. M. Costa, M. Barral-Netto, and J. Van Weyenbergh. 2006. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol* 79:36-39.
36. Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli, and G. Lauvau. 2008. Blood monocytes:

distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86:398-408.

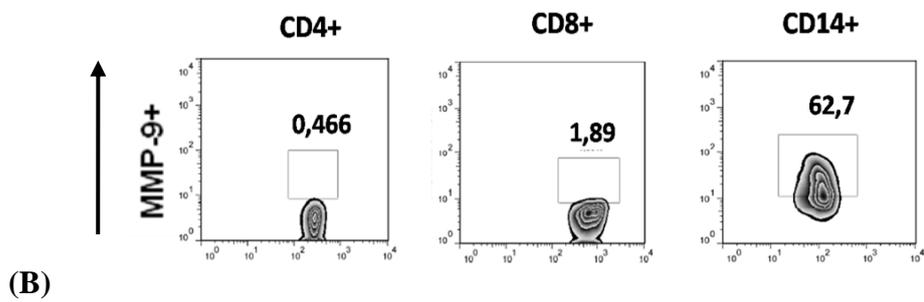
37. Longo, G. M., W. Xiong, T. C. Greiner, Y. Zhao, N. Fiotti, and B. T. Baxter. 2002. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 110:625-632.
38. Opendakker, G., P. E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, E. Van Coillie, S. Masure, P. Proost, and J. Van Damme. 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 69:851-859.
39. Ladwig, G. P., M. C. Robson, R. Liu, M. A. Kuhn, D. F. Muir, and G. S. Schultz. 2002. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 10:26-37.
40. Wysocki, A. B., L. Staiano-Coico, and F. Grinnell. 1993. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101:64-68.
41. Agren, M. S., W. H. Eaglstein, M. W. Ferguson, K. G. Harding, K. Moore, U. K. Saarialho-Kere, and G. S. Schultz. 2000. Causes and effects of the chronic inflammation in venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 210:3-17.
42. Leber, T. M., and F. R. Balkwill. 1998. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer* 78:724-732.
43. Xiong, W., J. MacTaggart, R. Knispel, J. Worth, Y. Persidsky, and B. T. Baxter. 2009. Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model. *J Immunol* 183:2741-2746.

FIGURES

Figure 1.

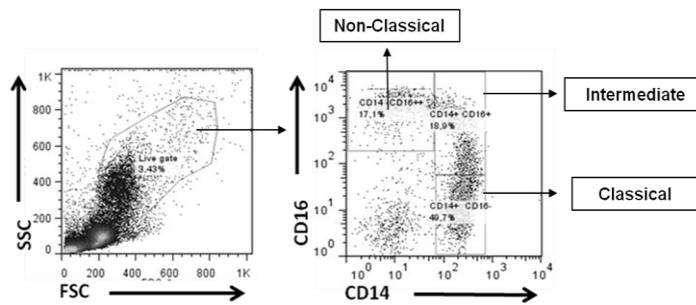


(A)

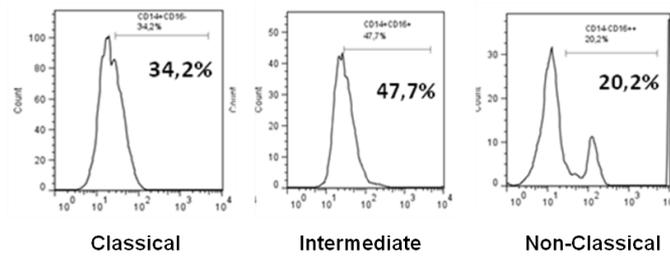


(B)

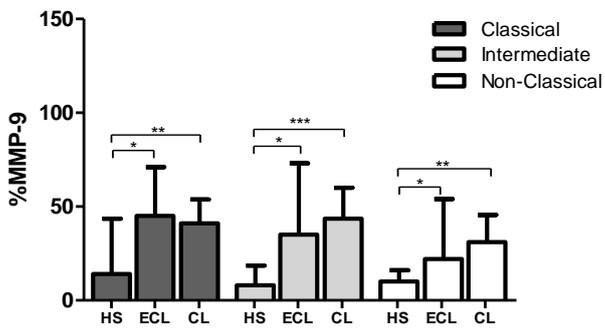
Figure 2.



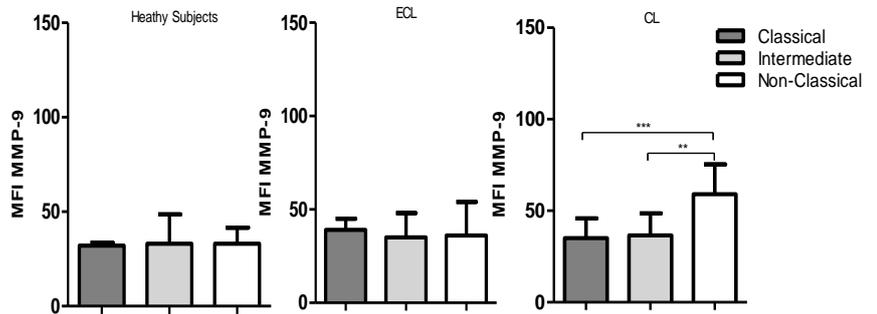
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 3.

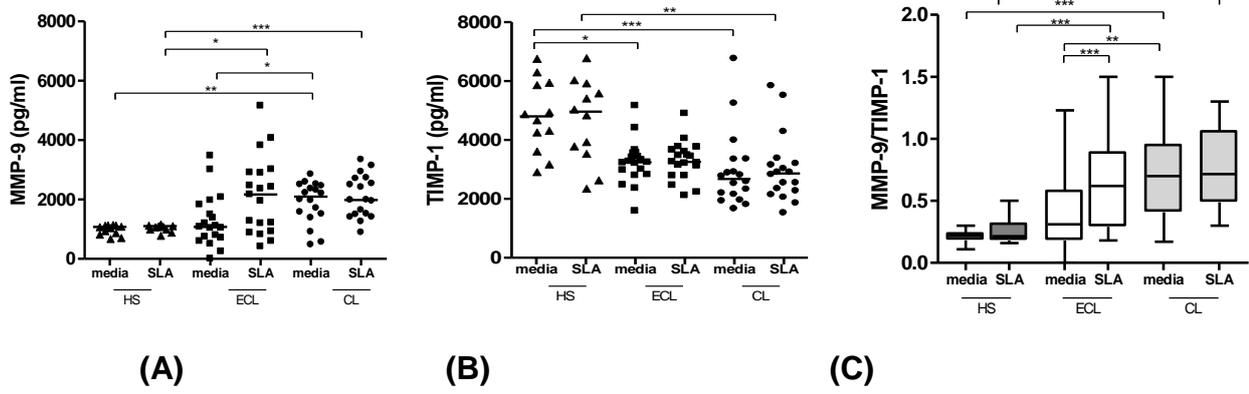


Figure 4.

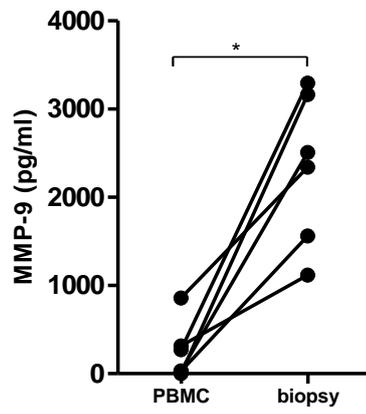


Figure 6.

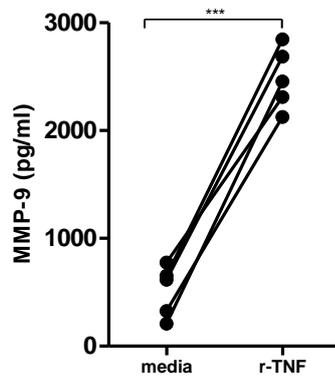
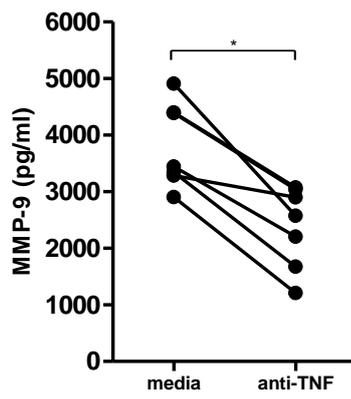


Figure 7.



VII. RESULTADOS:

VII.1 MMP-9 é produzida por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea

Considerando que MMP-9 é uma enzima capaz de degradar a membrana basal e que pode contribuir para o aparecimento da lesão de pacientes com leishmaniose cutânea, avaliamos a fonte celular da MMP-9 por estes pacientes. Demonstramos que tanto linfócitos TCD4+ quanto os TCD8+ produzem MMP-9, no entanto, as células CD14+ são as que apresentam maior frequência de células produzindo MMP-9 em pacientes com leishmaniose cutânea (Fig.1). Este experimento foi realizado em CMSP *ex-vivo* de pacientes com LC através de citometria de fluxo e demonstra que os monócitos produzem MMP-9 na infecção por *L. braziliensis*.

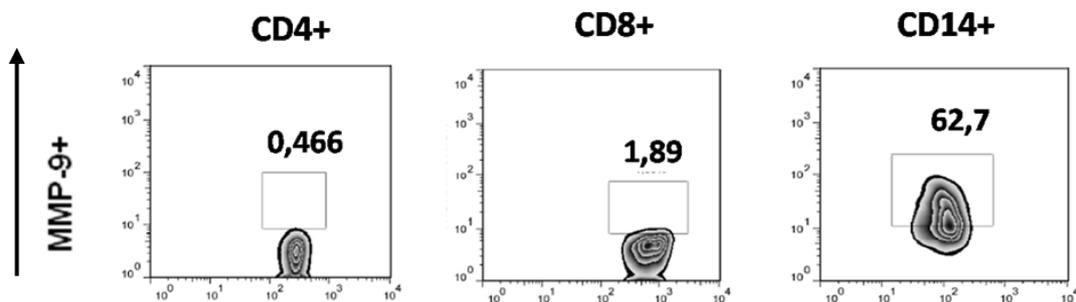
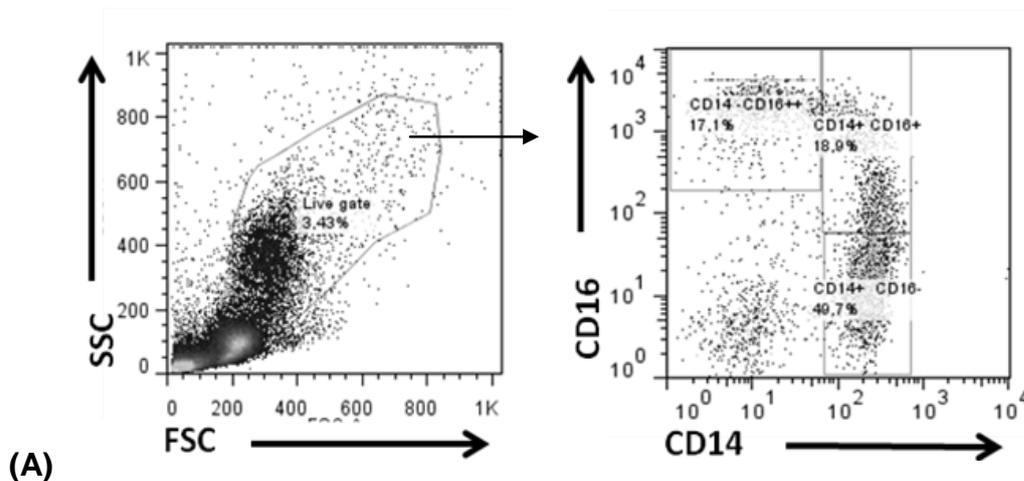


Figura 1. Monócitos de pacientes com LC produzem MMP-9. CMSP foram adquiridas de pacientes com LC (n=4) e marcação *ex-vivo* foi realizada para células CD4, CD8, CD14 e MMP-9 e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados através do FlowJo e demonstrado em frequência de células produtoras de MMP-9.

VII.2 Monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea expressam MMP-9

Recentemente três subpopulações de monócitos foram descritas baseadas na expressão de CD14 e CD16 (Zeigler, 2010). Com o objetivo de observar a frequência de MMP-9 nas três sub-populações de monócitos, realizamos a análise *ex-vivo* de CMSP de pacientes com LCR, LC e indivíduos saudáveis por citometria de fluxo. A figura 2A mostra a região (gate) de monócitos determinada de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) das células e as subpopulações de monócitos definidas a partir da expressão de CD14 e CD16. Na figura 2B a representação por histograma da expressão de MMP-9 em cada sub-população de monócitos. Nas figuras 2C e D observamos que monócitos de pacientes com LCR e LC expressam mais MMP-9 do que monócitos de indivíduos saudáveis e que os monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) são a principal fonte de MMP-9 em pacientes com LC.



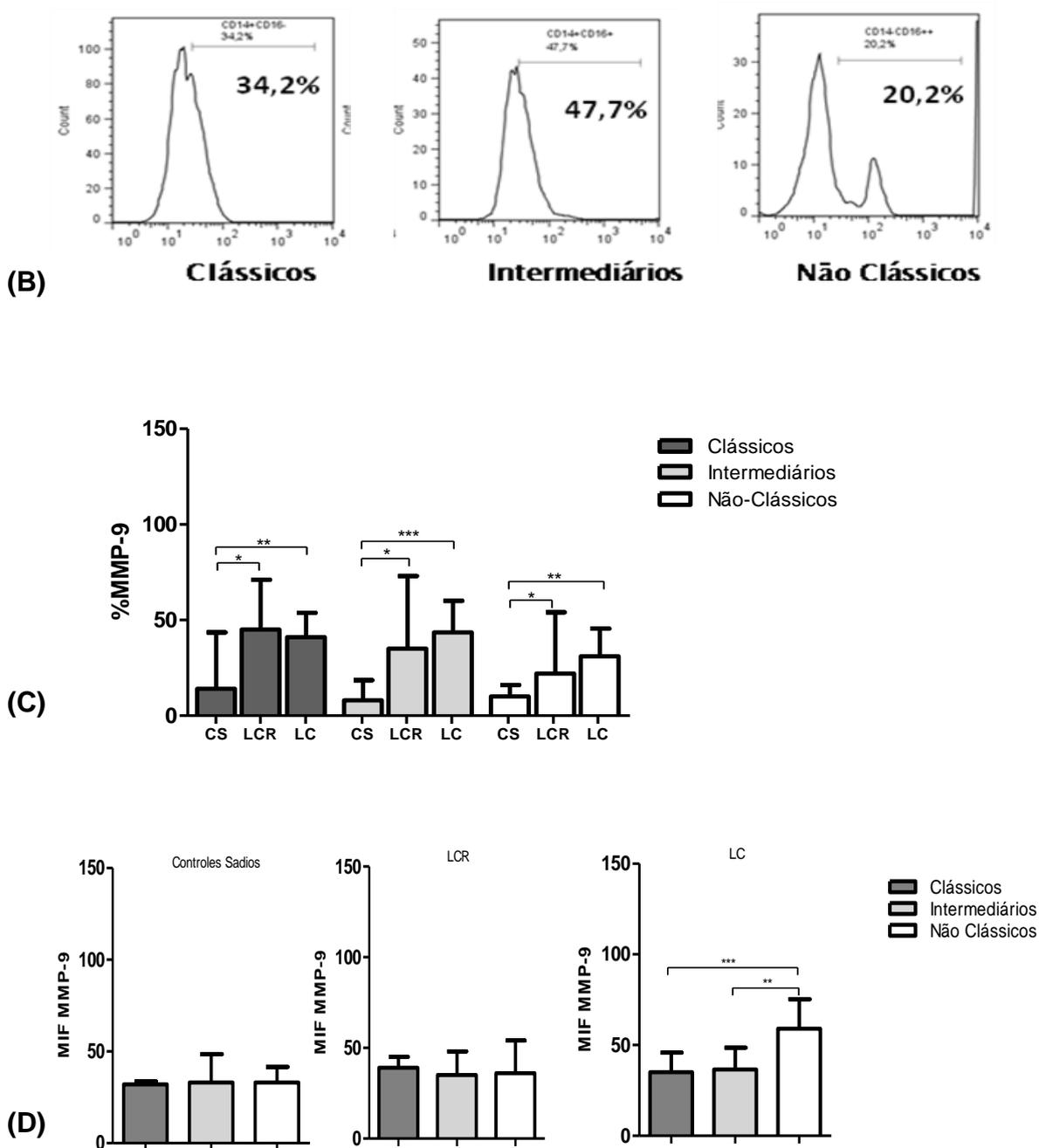


Figura 2. Monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea expressam MMP-9. CMSP foram obtidas de pacientes com LCR (n=11), LC (n=28) e indivíduos sadios (n=17), marcação *ex-vivo* foi realizada para células CD14, CD16 e MMP-9 e avaliadas por citometria de fluxo. (A) Estratégia para a determinação da região (gate) de monócitos e definição das subpopulações de monócitos a partir da expressão de CD14 e CD16. (B) Frequência de MMP-9 em cada subpopulação de monócitos determinada por histograma. (C) Frequência de MMP-9 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LCR e LC e de indivíduos sadios. (D) Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de MMP-9 nas sub-populações de monócitos de pacientes com LCR e LC e de indivíduos sadios. Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparações de médias entre os grupos, pós-teste de Dunn. Significância estatística $p < 0.005$.

VII.3 Desequilíbrio entre a produção de MMP-9 e TIMP-1 em pacientes com leishmaniose cutânea

Um desequilíbrio entre a razão MMPs/TIMPs - inibidor de MMPs - pode causar degradação excessiva da matriz extracelular e conseqüentemente dano tecidual. Para determinar o equilíbrio entre os níveis de produção de MMP-9 e seu inibidor TIMP-1, CMSP de pacientes com LCR, LC e de indivíduos sadios foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) por 72 horas e os níveis destas enzimas foram determinados por ELISA. Pacientes com LC apresentaram altos níveis de MMP-9 e baixos níveis de TIMP-1 e a razão MMP-9/TIMP-1 indicou um desequilíbrio na produção destas enzimas.

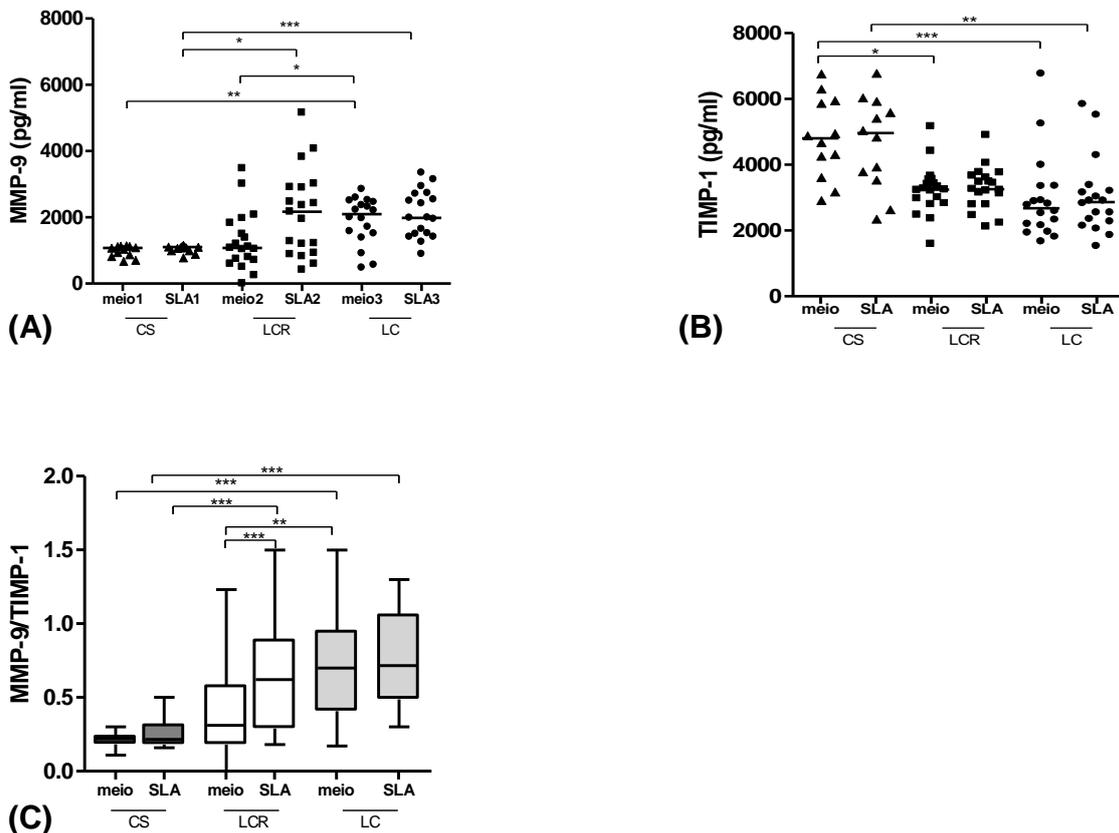


Figura 3. Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam altos níveis de MMP-9 e baixos níveis de TIMP-1 quando comparados a indivíduos sadios. Níveis de MMP-9 (Figura 3A) e TIMP-1 (Figura 3B), através de ELISA, em sobrenadantes de cultura de CMSP em meio ou estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (5ug/ml) por 72 horas de pacientes com LCR (n=17), LC (n=18) e indivíduos sadios (n=12). (Figura 3C) Razão entre os níveis de MMP-9/TIMP-1 em sobrenadantes de cultura de CMSP em meio ou estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (5ug/ml) por 72 horas de pacientes com LCR (n=17), LC (n=18) e indivíduos sadios (n=12).

VII.4 Lesões de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam níveis elevados de MMP-9

As MMPs são produzidas no sangue periférico por diversos tipos celulares e após sua secreção, migram para os tecidos, onde são capazes de degradar a matriz extracelular facilitando o influxo de células para os sítios inflamatórios. Desde que foi observado um desequilíbrio entre os níveis de MMP-9 e do seu inibidor TIMP-1 no sangue periférico de pacientes com LC, decidimos investigar se nas lesões destes pacientes a produção de MMP-9 estaria aumentada. Para isto, CMSP e células obtidas de biópsias de pacientes com LC foram colocadas em cultura por 12 horas e os níveis de MMP-9 foram determinados por ELISA.

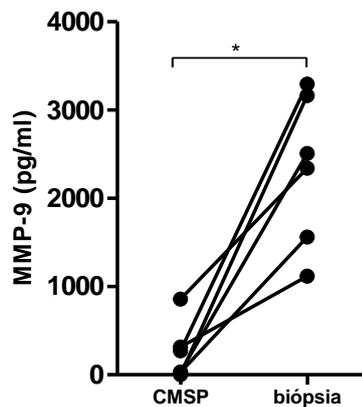


Figura 4. Lesões de pacientes com LC apresentam níveis mais elevados de MMP-9 quando comparados a CMSP. A produção de MMP-9 em biópsias e CMSP de pacientes com LC (N=6) foi determinada por ELISA após a cultura de células por 12h. Para a cultura de biópsia foi utilizado um fragmento de 5mm e para a cultura de CMSP foram utilizadas 3×10^6 de células.

VII.5 Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam altos níveis de TNF

A atuação de TNF na patologia da LC tem sido associada ao dano tecidual, sendo a indução de MMPs um dos seus mecanismos utilizados. Com o objetivo de avaliar a produção desta citocina nos pacientes com LC, CMSP

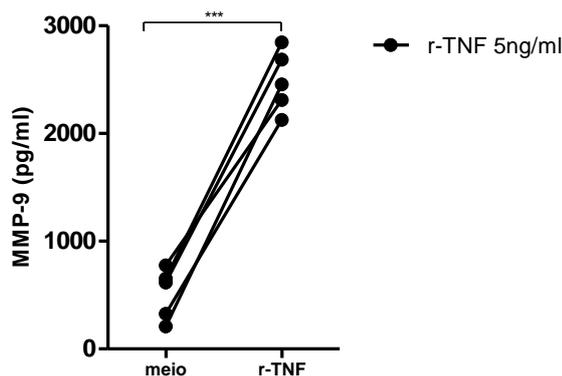


Figura 6. TNF induz a produção de MMP-9. CMSP de indivíduos sadios (n=5) foram colocadas em cultura na presença ou ausência de recombinante TNF (5ng/ml) por 24 horas e os níveis de MMP-9 foram determinados por ELISA. Teste de Wilcoxon utilizado para a análise pareada, significância estatística $p < 0.005$.

VII.7 Neutralização de TNF diminui a produção de MMP-9 em pacientes com leishmaniose cutânea

Com o objetivo de verificar se a produção de MMP-9 nos pacientes com LC estava associada ao TNF, CMSP de pacientes com LC foram cultivadas na presença ou ausência de anticorpo anti-TNF e os níveis de MMP-9 foram determinados por ELISA.

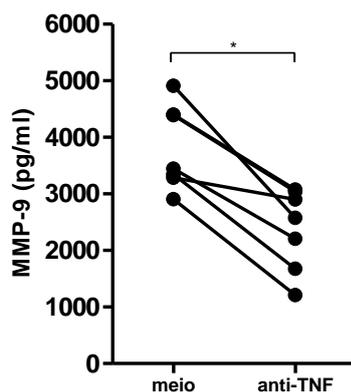


Figura 7. Neutralização de TNF diminui a produção de MMP-9 em pacientes com LC. CMSP de LC (n = 7) foram cultivadas na ausência ou presença (Figura B) de anti-TNF (10ug/ml) durante 24 horas. Os níveis de MMP-9 foram mensurados por ELISA. Análise pareada utilizando o teste de Wilcoxon, significância estatística $p < 0.005$.

VIII. DISCUSSÃO

As MMPs possuem um papel essencial nos processos fisiológicos como migração celular, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular. Porém, a expressão elevada e a secreção descontrolada destas enzimas têm sido associadas a processos patológicos (Murphy e Nagase, 2008), sendo a migração de macrófagos dependente de MMP-9 (Tomlinson, Garcia-Morales *et al.*, 2008). Uma vez que a infecção de macrófagos por *L. braziliensis* aumenta a expressão de MMP-9 nessas células (Maretti-Mira, De Pinho Rodrigues *et al.*, 2011), investigamos a contribuição das sub-populações de monócitos para produção de MMP-9 na leishmaniose cutânea. E observamos que pacientes com LCR e LC expressam mais MMP-9 do que indivíduos saudáveis, sendo a sub-população de monócitos não-clássicos a principal fonte produtora de MMP-9 na LC e TNF um importante indutor desta produção.

Durante os processos infecciosos, os monócitos são recrutados para sítios inflamatórios e produzem fatores solúveis a exemplos de citocinas, quimiocinas e enzimas, em resposta a patógenos (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011 ; Ziegler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010). Na leishmaniose, os macrófagos são os principais reservatórios do parasita, sendo responsáveis pelo controle da infecção (Rittig e Bogdan, 2000). Como os monócitos circulantes são células precursoras de macrófagos, investigamos a produção de MMP-9 por estas células. E observamos que monócitos são as principais células produtoras de MMP-9 em pacientes com LC quando comparados aos linfócitos TCD4+ e TCD8+ (figura 1). Esse dado foi também demonstrado em outras doenças infecciosas, como na malária (Prato, Giribaldi *et al.*, 2005) e na tuberculose (Price, Gilman *et al.*, 2003), nas quais MMP-9 foi produzida predominantemente por monócitos. Como a migração de monócitos para o tecido requer a degradação da membrana basal e da matriz extracelular (Nagase, 1997; Sellebjerg e Sorensen, 2003; Visse e Nagase, 2003), a produção de MMP-9 por monócitos é essencial para a migração destas células para os sítios inflamatórios.

Os monócitos possuem três sub-populações de acordo com a expressão de CD14 e CD16 (figura 2A e 2B) e cada sub-população possui papéis distintos durante os processos infecciosos. Os monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) apresentam uma alta capacidade fagocítica e expressam mais proteínas anti-microbidas, atuando como primeira linha de defesa da resposta imune inata contra patógenos intracelulares. Enquanto, os monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) são responsáveis pela produção de oxigênio reativo e expressam mais MHC-II atuando de forma mais eficiente como células apresentadoras de antígenos, do que as outras sub-populações de monócitos. E os monócitos não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) são mais maduros, devido a maior expressão de CD16, e produzem mais citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células para os sítios inflamatórios (Zawada, Rogacev *et al.*, 2011; Ziegler-Heitbrock, Ancuta *et al.*, 2010). Neste trabalho, pacientes com a forma recente e clássica da leishmaniose cutânea apresentaram maior frequência de monócitos expressando MMP-9 em todas as sub-populações (clássicos, intermediários e não-clássicos) quando comparados aos indivíduos saudáveis (figura 2C). Além disso, alguns pacientes com LC apresentaram um aumento da média de intensidade de fluorescência (MIF) dos monócitos não-clássicos (figura 2D), indicando que esta sub-população é responsável pela produção de MMP-9 nestes indivíduos. Soares *et al.* em 2006, observaram aumento da frequência e da MIF dos monócitos CD16⁺ em pacientes com LC (Soares, Barral *et al.*, 2006). A produção de MMP-9 pelos monócitos não-clássicos pode ser explicado pelo fato de que estes apresentam uma alta expressão de CD16 e uma baixa expressão de CD14, assim como os macrófagos (Geissmann, Auffray *et al.*, 2008). É possível que esta seja a principal sub-população precursora de macrófagos e que ao migrarem para os tecidos estas células produzam citocinas e enzimas, a exemplo de MMP-9, que participam do processo inflamatório tecidual. A degradação excessiva da matriz em doenças inflamatórias como o aneurisma aórtico, tem sido atribuída à produção de MMP-9 por monócitos (Longo, Xiong *et al.*, 2002). Esse dado corrobora com os achados do nosso estudo, confirmando a participação dos monócitos para produção de MMP-9.

Após secretada, MMP-9 é extremamente regulada por seu inibidor TIMP-1, sendo a razão 1:1 da enzima por seu inibidor indicativo da inibição da atividade de MMP-9 (Opdenakker, Van Den Steen *et al.*, 2001). Nós observamos que em sobrenadantes de CMSP pacientes com LCR e LC apresentaram níveis mais elevados de MMP-9 (figura 3A) e níveis mais baixos do inibidor TIMP-1 (figura 3B) quando comparados a indivíduos saudáveis, e os pacientes com LC apresentaram desequilíbrio entre os níveis de MMP-9/TIMP-1 (figura 3C). Em pacientes com úlceras de pressão crônicas que falharam à cicatrização, a razão MMP-9/TIMP-1 foi maior do que em pacientes cuja as úlceras cicatrizaram, estes dados sugerem que a proporção dos níveis de MMP-9/TIMP-1 pode ser um preditor de cicatrização, sugerindo que níveis elevados de MMPs e baixos níveis TIMPs prejudicam a cicatrização dessas feridas (Ladwig, Robson *et al.*, 2002). *In vitro*, macrófagos de pacientes com história prévia de LC e LM apresentaram desequilíbrio entre os níveis de MMP-9 e TIMP-1, mas sem diferença entre os dois grupos (Maretti-Mira, De Pinho Rodrigues *et al.*, 2010). A perda do controle da produção de MMPs pode resultar na degradação patológica de tecidos (Murphy e Nagase, 2008). Pacientes com a forma recente da leishmaniose apresentam níveis mais baixos de MMP-9 do que pacientes com a forma cutânea, é possível que a evolução da pápula para a úlcera seja em razão do aumento dos níveis de MMP-9 e consequente desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1.

A atividade elevada de MMP-9 contribui para a não cicatrização de úlceras venosas crônicas em membros inferiores (Wysocki, Staiano-Coico *et al.*, 1993; Agren, Eaglstein *et al.*, 2000). Nos pacientes com LC observamos níveis mais elevados de MMP-9 em sobrenadantes de biópsias quando comparados a CMSP (figura 4). Em modelo murino de infecção por *L. chagasi*, a produção de MMP-9 por macrófagos esteve associada ao dano tecidual (Costa, Nogueira De Melo *et al.*, 2008). Maretti-Mira *et al.*, em 2010, observaram em lesões de pacientes com LC que falharam ao tratamento, número elevado de células produzindo INF- γ e altos níveis de atividade gelatinolítica (Maretti-Mira, De Oliveira-Neto *et al.*, 2010). Estes dados sugerem

que os níveis elevados de MMP-9 encontrados nas lesões de pacientes com LC possam estar associados ao dano tecidual.

A produção de MMP-9 não é espontânea, sendo dependente da interação de célula-célula e célula-matriz, assim como da secreção de citocinas (Nagase, 1997). TNF é considerado o principal indutor de MMP-9 (Leber e Balkwill, 1998; Ansari, Katara *et al.*, 2008) e a sua associação com o dano tecidual na LTA já foi documentado (Antonelli, Dutra *et al.*, 2005). Neste trabalho, observamos que pacientes com LC produzem altos níveis de TNF quando estimulados com SLA (figura 5), dado também encontrado por outros autores na LC (Ribeiro-De-Jesus, Almeida *et al.*, 1998; Antonelli, Dutra *et al.*, 2005). Esta citocina está intimamente relacionada aos níveis de MMP-9 produzidos por monócitos nos pacientes deste estudo. TNF é uma importante citocina inflamatória envolvida na regulação imune e resistência a vários microorganismos, exercendo uma variedade de atividades biológicas como apoptose, citotoxicidade e indução de metaloproteinases (Baugh e Bucala, 2001; Gupta, 2002; Lehmann, Edgar *et al.*, 2005). Confirmamos a capacidade de TNF induzir a secreção de MMP-9 através da administração de recombinante de TNF (rTNF) exógeno à cultura de CMSP de indivíduos saudáveis, a qual foi acompanhada pelo aumento dos níveis de MMP-9 (figura 6), enquanto que a neutralização de TNF por anticorpo bloqueador (anti-TNF) em cultura de CMSP de pacientes com LC resultou na diminuição dos níveis de MMP-9 (figura 7). Em outras doenças também foi observada associação de TNF com MMP-9. Como exemplo, na *Malária falciparum*, a ativação de MMP-9 foi dependente da produção de TNF e anulada por anticorpos anti-TNF (Prato, Giribaldi *et al.*, 2005). Outro exemplo desta associação foi demonstrado em modelo murino de indução de aneurisma, sendo a deficiência de TNF responsável pela diminuição da regulação de MMP-2 e MMP-9, e consequente prevenção da formação do aneurisma (Xiong, Mactaggart *et al.*, 2009).

Como pacientes com LC apresentam níveis elevados de TNF e estes níveis se associam à destruição tecidual, acreditamos que um mecanismo importante do TNF para a formação da úlcera seja a indução de MMP-9. Assim, o

estímulo excessivo de TNF para a produção de MMP-9 levaria ao desequilíbrio entre a produção desta enzima e seu inibidor, TIMP-1, com consequente degradação excessiva da membrana basal, facilitando a migração de células inflamatórias para o sítio de inoculação do parasita, favorecendo o surgimento da úlcera.

IX. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Este estudo investigou a contribuição das sub-populações de monócitos para a produção de MMP-9 em pacientes com leishmaniose cutânea observando que indivíduos com as formas recente e clássica da leishmaniose apresentam níveis mais elevados de MMP-9 quando comparados a indivíduos saudáveis. Com isso, propomos a continuidade deste estudo com a criação de uma Coorte com pacientes com as formas LCR, LC e LD e indivíduos com infecção sub-clínica por *L. braziliensis* com o objetivo de avaliar a associação de MMP-9 com a disseminação da doença e falha terapêutica.

X. CONCLUSÃO

Monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea produzem MMP-9 em resposta aos altos níveis de TNF.

XI. SUMMARY

Monocyte Production of Matrix Metalloproteinase 9 in patients with cutaneous leishmaniasis

Background: Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by the presence of one or more ulcerated lesions of raised edges. CD4 + and CD8 + serve as source producing cytokines that activate macrophages to destroy the parasites. Circulating monocytes are a heterogeneous population subdivided into classical monocytes (CD14 + CD16), intermediate monocytes (CD14 + CD16 +) and non-classical monocytes (CD14-CD16 +), and are known to migrate to inflammatory sites and secrete cytokines. TNF can mediate the pathology of CL through various mechanisms including, induction of nitric oxide (NO), increased cytotoxicity and expression of matrix metalloproteinases (MMPs). MMP-9 is a zinc-dependent enzyme which degrades type IV collagen, a component of basal membrane, and is controlled by TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1). Recently, it was demonstrated that infection of macrophages by *L. braziliensis* increases the expression of MMP-9. Although the factors that induce the breakdown of the basal membrane leading to the development of ulcer are unknown, it is likely that MMP-9 contributes to tissue injury in the CL. **Aim:** Investigate the contribution of sub-populations of monocytes to production of MMP-9 and their participation in the development of tissue injury in infection by *L. braziliensis*. **Study Design:** Cross-sectional study with 28 patients with CL, 12 with early CL and 20 healthy controls. **Materials and Methods:** Mononuclear cells were obtained for *ex-vivo* labeling of sub-populations of monocytes and MMP-9, and the frequency determined by flow cytometry. Culture was performed for 72 hours, stimulating the cells with SLA, levels of MMP-9 and TIMP-1 in supernatants were determined by ELISA. **Results:** Monocytes were major cells producing MMP-9 and all three sub-populations of monocytes from patients with early CL and CL more expressed MMP-9, compared with those in healthy individuals. In patients with CL non-classical monocytes producer was the main source of MMP-9. Elevated levels of MMP-9 and lower levels of TIMP-1 were found in culture supernatants from PBMC of patients with cutaneous leishmaniasis. **Conclusion:** High levels of TNF in patients with cutaneous leishmaniasis contribute to MMP-9 production by monocytes. **Key words:** Cutaneous leishmaniasis, monocytes, matrix metalloproteinases

XII. REFERÊNCIAS

- Adams, D. H. e A. R. Lloyd. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, v.349, n.9050, Feb 15, p.490-5. 1997.
- Agren, M. S., W. H. Eaglstein, et al. Causes and effects of the chronic inflammation in venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, v.210, p.3-17. 2000.
- Ansari, N. A., G. K. Katara, et al. Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, v.154, n.3, Dec, p.391-8. 2008.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*, v.101, n.2, Nov 15, p.226-30. 2005.
- Bacellar, O., H. Lessa, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, v.70, n.12, Dec, p.6734-40. 2002.
- Barbalat, R., L. Lau, et al. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat Immunol*, v.10, n.11, Nov, p.1200-7. 2009.
- Barral-Netto, M., A. Barral, et al. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, v.17, n.1, Jan, p.21-8. 1995.
- Barral-Netto, M., C. Brodskyn, et al. Human_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.1, Jan, p.149-55. 1998.
- Barral, A., M. Barral-Netto, et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg*, v.47, n.5, Nov, p.587-92. 1992.
- Barral, A., J. Guerreiro, et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*, v.53, n.3, Sep, p.256-9. 1995.
- Baugh, J. A. e R. Bucala. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*, v.4, n.5, Sep, p.635-50. 2001.
- Belge, K. U., F. Dayyani, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, v.168, n.7, Apr 1, p.3536-42. 2002.

Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.4, n.2, p.197-250. 1993.

Brelaz, M. C., A. P. De Oliveira, et al. Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol*, Dec 28.

Carvalho, E. M., O. Bacellar, et al. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v.152, n.12, Jun 15, p.5949-56. 1994.

Carvalho, E. M., A. Barral, et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, v.56, n.4, Apr, p.315-25. 1994.

Carvalho, E. M., W. D. Johnson, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*, v.135, n.6, Dec, p.4144-8. 1985.

Carvalho, L. P., S. Passos, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*, v.29, n.5, May, p.251-8. 2007.

_____. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol*, v.3, p.301.

Castellano, L. R., D. C. Filho, et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. *Hum Immunol*, v.70, n.6, Jun, p.383-90. 2009.

Costa, J. D., A. C. Nogueira De Melo, et al. In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by Leishmania chagasi-infected macrophages. *Acta Trop*, v.106, n.3, Jun, p.175-83. 2008.

Costa, J. M., L. A. Barrios, et al. Topical pentostam in an attempt to produce more rapid healing of skin ulcers due to Leishmania braziliensis braziliensis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.19, n.3, Jul-Sep, p.199-200. 1986.

Da-Cruz, A. M., A. L. Bertho, et al. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol*, v.153, n.3, Sep, p.537-43. 2005.

Da-Cruz, A. M., R. Bittar, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.9, n.2, Mar, p.251-6. 2002.

De Oliveira-Neto, M. P., M. S. Mattos, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol*, v.39, n.7, Jul, p.506-14. 2000.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

Elkington, P. T., C. M. O'kane, et al. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*, v.142, n.1, Oct, p.12-20. 2005.

Faria, D. R., P. E. Souza, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, v.31, n.8, Aug, p.432-9. 2009.

Follador, I., C. Araujo, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*, v.34, n.11, Jun 1, p.E54-8. 2002.

Gaze, S. T., W. O. Dutra, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol*, v.63, n.1, Jan, p.70-8. 2006.

Geissmann, F., C. Auffray, 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*, v.86, n.5, Jul, p.398-408. 2008.

Goetzl, E. J., M. J. Banda, et al. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol*, v.156, n.1, Jan 1, p.1-4. 1996.

Gomes-Silva, A., R. De Cassia Bittar, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*, v.149, n.3, Sep, p.440-4. 2007.

Goncalves, R., X. Zhang, et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med*, v.208, n.6, Jun 6, p.1253-65.

Gorak, P. M., C. R. Engwerda, et al. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*, v.28, n.2, Feb, p.687-95. 1998.

Gottschall, P. E. e S. Deb. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation*, v.3, n.2-3, Mar-Jun, p.69-75. 1996.

Gross, J. e C. M. Lapiere. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.48, Jun 15, p.1014-22. 1962.

Gupta, M., S. Mahanty, et al. Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro. *Virology*, v.284, n.1, May 25, p.20-5. 2001.

Gupta, S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol*, v.22, n.4, Jul, p.185-94. 2002.

Jirmanus, L., M. J. Glesby, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg*, v.86, n.3, Mar, p.426-33.

Ladwig, G. P., M. C. Robson, et al. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*, v.10, n.1, Jan-Feb, p.26-37. 2002.

Leber, T. M. e F. R. Balkwill. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer*, v.78, n.6, Sep, p.724-32. 1998.

Lehmann, W., C. M. Edgar, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*, v.36, n.2, Feb, p.300-10. 2005.

Lemos, M. P., F. Esquivel, et al. MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *J Exp Med*, v.199, n.5, Mar 1, p.725-30. 2004.

Llanos Cuentas, E. A., C. C. Cuba, et al. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.78, n.6, p.845-6. 1984.

Longo, G. M., W. Xiong, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*, v.110, n.5, Sep, p.625-32. 2002.

Machado, P., C. Araujo, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis*, v.34, n.12, Jun 15, p.E69-73. 2002.

Maretti-Mira, A. C., M. P. De Oliveira-Neto, et al. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*, v.163, n.2, Feb, p.207-14.

Maretti-Mira, A. C., K. M. De Pinho Rodrigues, et al. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop*, v.119, n.2-3, Aug, p.160-4.

Mirastschijski, U., U. Impola, et al. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol*, v.33, n.3, Mar, p.355-64. 2002.

Mosmann, T. R. e R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, v.7, p.145-73. 1989.

Murphy, G. e H. Nagase. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, v.29, n.5, Oct, p.290-308. 2008.

Murphy, G., F. Willenbrock, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci*, v.732, Sep 6, p.31-41. 1994.

Murray, H. W., J. D. Berman, et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v.366, n.9496, Oct 29-Nov 4, p.1561-77. 2005.

Nagase, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, v.378, n.3-4, Mar-Apr, p.151-60. 1997.

Nagase, H., Y. Ogata, et al. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*, v.19, n.3, Aug, p.715-8. 1991.

Oliveira-Neto, M. P., V. J. Martins, et al. South American cutaneous leishmaniasis of the eyelids: report of five cases in Rio de Janeiro State, Brazil. *Ophthalmology*, v.107, n.1, Jan, p.169-72. 2000.

Opendakker, G., P. E. Van Den Steen, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*, v.69, n.6, Jun, p.851-9. 2001.

Passlick, B., D. Flieger, et al. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, v.74, n.7, Nov 15, p.2527-34. 1989.

Pirmez, C., M. P. Oliveira-Neto, et al. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. Modulation of MHC class II gene products by keratinocytes

before and after glucantime therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.85, n.2, Apr-Jun, p.203-9. 1990.

Pirmez, C., M. Yamamura, et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*, v.91, n.4, Apr, p.1390-5. 1993.

Prato, M., G. Giribaldi, et al. Phagocytosis of hemozoin enhances matrix metalloproteinase-9 activity and TNF-alpha production in human monocytes: role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of falciparum malaria. *J Immunol*, v.175, n.10, Nov 15, p.6436-42. 2005.

Price, N. M., R. H. Gilman, et al. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol*, v.171, n.10, Nov 15, p.5579-86. 2003.

Ribeiro-De-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.1, Jan, p.143-8. 1998.

Rittig, M. G. e C. Bogdan. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, v.16, n.7, Jul, p.292-7. 2000.

Schriefer, A., A. L. Schriefer, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*, v.72, n.1, Jan, p.508-14. 2004.

Scott, P., P. Natovitz, et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med*, v.168, n.5, Nov 1, p.1675-84. 1988.

Scott, P., E. Pearce, et al. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev*, v.112, Dec, p.161-82. 1989.

Sellebjerg, F. e T. L. Sorensen. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull*, v.61, n.3, Aug 15, p.347-55. 2003.

Serbina, N. V., T. Jia, et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, v.26, p.421-52. 2008.

Soares, G., A. Barral, et al. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. *J Leukoc Biol*, v.79, n.1, Jan, p.36-9. 2006.

- Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol*, v.10, n.10, Oct, p.712-23.
- Sternlicht, M. D. e Z. Werb. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.17, p.463-516. 2001.
- Stroher, U., E. West, et al. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol*, v.75, n.22, Nov, p.11025-33. 2001.
- Teles, R. M., R. B. Teles, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun*, v.78, n.3, Mar, p.1012-21.
- Tomlinson, M. L., C. Garcia-Morales, et al. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. *Mech Dev*, v.125, n.11-12, Nov-Dec, p.1059-70. 2008.
- Turetz, M. L., P. R. Machado, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*, v.186, n.12, Dec 15, p.1829-34. 2002.
- Unger, A., S. O'neal, et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.80, n.4, Apr, p.574-9. 2009.
- Visse, R. e H. Nagase. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, v.92, n.8, May 2, p.827-39. 2003.
- Wysocki, A. B., L. Staiano-Coico, et al. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol*, v.101, n.1, Jul, p.64-8. 1993.
- Xiong, W., J. Mactaggart, et al. Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model. *J Immunol*, v.183, n.4, Aug 15, p.2741-6. 2009.
- Zawada, A. M., K. S. Rogacev, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, v.118, n.12, Sep 22, p.e50-61.
- Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*, v.81, n.3, Mar, p.584-92. 2007.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, v.116, n.16, Oct 21, p.e74-80.

ANEXO I.

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo será solicitado a assinar este termo de consentimento.

Participação Voluntária – A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Você tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasão de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar a sua participação, este será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com leishmaniose.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores se você irá desenvolver lesão após você ser infectado pela *Leishmania*. Para tal nós analisaremos seu sangue, e material da lesão (caso você apresente uma) obtida através de um pequeno fragmento da sua pele.

Procedimento – Você será examinado por um médico e será feito um teste na pele de rotina. Nós iremos realizar procedimentos de rotina para definir o diagnóstico da leishmaniose, como biópsia ou aspirado da lesão com agulha ou aspirado do linfonodo. Caso você concorde em participar do estudo você doará de 30 ml a 60ml de sangue (cerca de 3 a 6 colheres de café). Nós usaremos esse sangue para realizar os testes, incluindo gravidez, açúcar no sangue, função renal, HIV, que irão esclarecer o mecanismo envolvido na sua defesa contra a *Leishmania*. Caso o seu teste de HIV seja positivo nós iremos direcionar você para um médico no departamento de doenças infecciosas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Ba. Em caso de não confirmado o diagnóstico de leishmaniose, nós iremos destruir qualquer amostra de sangue ou tecido que tenham sido coletadas para esta pesquisa. Os procedimentos seguintes são envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você se sentar até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Isso é muito menos do que a

Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue. **Biópsia da Lesão:** a biópsia do tecido será realizada no centro de uma lesão cutânea após anestesia.

Período do Estudo: Sua participação neste estudo começa com a coleta de sangue e biópsia da lesão, no caso de você ter uma. Após realização da coleta de sangue e biópsia, sua participação no estudo está terminada. Nós iremos pedir que você retorne a cada mês durante um ano como parte de seu acompanhamento. Essas visitas irão ajudar a determinar a cura ou a necessidade de um novo ciclo de tratamento com Glucantime ou outra droga, a qual também será dada sem custo para você. Isso não faz parte da pesquisa.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local e infecção. Biópsia da lesão: os riscos de biópsia da lesão são os mesmos da coleta de sangue e além destes uma cicatriz da biópsia. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a biópsia da lesão ou coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele ou membrana mucosa e da lesão com assepsia antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão após a biópsia para parar sangramento. Perda potencial da confidencialidade pode ocorrer.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do seu corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do seu corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, sua participação no estudo não trará nenhum benefício direto a você. O tratamento que você vai receber (Glucantime) é o mesmo tratamento recebido por qualquer paciente.

Custos – Você não terá nenhum custo com o tratamento com antimoniais ou qualquer outra droga contra a leishmaniose que seja necessária. Você não terá custos com a sua participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr Luiz Henrique Guimarães. Se você tem qualquer pergunta sobre seus direitos como um sujeito da pesquisa, você pode contactar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), telefone número: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO II.

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA MENORES DE 18 ANOS Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela – 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela – 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Nós perguntaremos a você e seus responsáveis sobre sua saúde. Um médico irá fazer um exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isso não irá machucar você. Então, nós iremos coletar sangue (cerca de 2 colheres de café) do seu braço usando uma agulha e uma seringa para fazer os testes que irão explicar a doença. Nós faremos um teste na sua pele, que será injetado uma pequena quantidade (duas gotas) no seu braço usando uma agulha. Se você tiver uma lesão na pele, vamos retirar um pequeno fragmento para diagnóstico. Isso será feito por um médico no posto de saúde, com anestesia local para você não sentir dor. Nós esperamos que durante o estudo possamos aprender mais sobre a doença, para poderemos preveni-la no futuro. Você não precisa participar deste estudo. Se você quiser nos ajudar, por favor marque ou assinie no local abaixo.

Sim, aceito participar do estudo.

Não aceito participar do estudo.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Responsável pelo menor Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

ANEXO III.

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA RESPONSÁVEIS / GUARDIÕES DE MENORES DE 18 ANOS Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Sua criança é convidada a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao médico. Caso sua criança decida participar do estudo será solicitado que este termo de consentimento para os responsáveis seja assinado.

Participação Voluntária – A participação da sua criança é voluntária. Sua criança pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Sua criança tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasão de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Se depois de aceitar participar, sua criança resolver descontinuar a participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para a criança. Participando ou não do estudo a criança receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com leishmaniose.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores para saber se sua criança irá desenvolver lesão após ser infectada pela *Leishmania*. Para tal nós analisaremos o sangue e material da lesão (se a criança tiver uma lesão) obtida através de um pequeno fragmento da pele da criança.

Procedimento – A criança será examinada por um médico e será feito um teste na pele de rotina. Nós iremos realizar procedimentos de rotina para definir o diagnóstico da leishmaniose, como biópsia ou aspirado da lesão com agulha ou aspirado do linfonodo se a criança tiver uma lesão na pele ou linfonodo aumentado. Caso a criança concorde em participar do estudo ela doará de 30 ml a 60ml de sangue (cerca de 3 a 6 colheres de café). Nós usaremos esse sangue para realizar os testes, incluindo gravidez, açúcar no sangue, função renal, HIV, que irão esclarecer o mecanismo envolvido na defesa de sua

criança contra a *Leishmania*. Caso o teste de HIV seja positivo nós iremos lhe encaminhar com a criança para um médico no departamento de doenças infecciosas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Ba. Em caso de não confirmado o diagnóstico de leishmaniose, nós iremos destruir qualquer amostra de sangue ou tecido que tenham sido coletadas para esta pesquisa. Os procedimentos seguintes são envolvidos neste estudo. **Coleta de sangue:** Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você se sentar até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Esta quantidade é muito menor do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue. **Biópsia da Lesão:** Se a criança tiver uma lesão na pele a biópsia do tecido será realizada na borda da lesão após anestesia local para evitar dor.

Período do Estudo: A participação da criança neste estudo começa com a coleta de sangue e biópsia da lesão, se a criança tiver uma. Após realização da coleta de sangue e biópsia, a participação da criança no estudo está terminada. Nós iremos pedir que a criança retorne a cada mês durante um ano como parte de seu acompanhamento. Essas visitas irão ajudar a determinar a cura ou a necessidade de um novo ciclo de tratamento com Glucantime ou outra droga, a qual também será dada sem custo para criança. Isso não faz parte da pesquisa.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. A criança e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local e infecção. Biópsia da lesão: os riscos de biópsia da lesão são os mesmos da coleta de sangue e além destes uma cicatriz da biópsia. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a biópsia da lesão ou coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele e da lesão com assepsia antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão para parar o sangramento. Perda potencial da confidencialidade pode ocorrer.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do seu corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do seu corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, a participação da criança no estudo não trará nenhum benefício direto a você. O tratamento que criança vai receber (Glucantime) é o mesmo tratamento recebido por qualquer paciente.

Custos – A criança não terá nenhum custo com o tratamento com antimoniais ou qualquer outra droga contra a leishmaniose que seja necessária. A criança não terá custos com a participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você ou sua criança precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr Luiz Henrique Guimarães.

Se você tem qualquer pergunta sobre seus direitos de sua criança como um sujeito da pesquisa, você pode contactar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), telefone número: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do Responsável Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO IV.

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA CONTROLES SADIOS

Protocolo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia o papel de monócitos na patogênese da leishmaniose cutânea

Nome do Projeto:

“Participação de células fagocíticas na patogênese da leishmaniose cutânea”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Médico, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia.

Comitê de Ética: Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, S/N – Canela - 40110-160 – Salvador – Bahia. Tel.: (71) 3283.8140.

Nº do Projeto: _____

Convite e objetivo – Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo entender as razões do desenvolvimento da leishmaniose cutânea. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo será solicitado a assinar este termo de consentimento.

Participação Voluntária – A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento.

Finalidade – O objetivo deste estudo é encontrar marcadores que irão servir como preditores se indivíduos infectados pela *Leishmania* irão desenvolver lesão. Para tal nós analisaremos seu sangue e comparar com o obtido de pessoas com leishmaniose.

Procedimento – Caso aceite participar do estudo, solicitaremos a doação de 60 ml do seu sangue (entre 3 a 6 colheres de sopa). Os seguintes procedimentos estão envolvidos neste estudo. Coleta de sangue: Nós iremos aplicar um garrote no seu braço e será feita limpeza da área com álcool. Usando uma agulha estéril e seringa, nós iremos coletar sangue de uma veia do seu braço. Após isso será solicitado para você continuar sentado até que o sangramento pare e tenhamos certeza de que você não tem nenhuma reação colateral. Isso é muito menos do que a Cruz Vermelha e os centros de Hematologia Brasileiros têm para a doação de sangue.

Período do Estudo: Sua participação neste estudo começa com a coleta de sangue. Após a coleta de sangue sua participação neste estudo terá terminado.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida durante o estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo e a organização que protege os indivíduos envolvidos em pesquisa (Escritório americano de proteção a seres humanos participantes em pesquisa). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) poderá ver os dados dos pacientes. Você e qualquer

participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise dos Riscos e Benefícios: Coleta de sangue: riscos da coleta de sangue incluem hemorragia local, infecção e vertigens ou desmaios. Os riscos de hemorragia ou infecção durante a coleta de sangue serão minimizados através da limpeza da pele com antisséptico antes do procedimento, uso de instrumentos estéreis, e aplicação de pressão no local da lesão após a biópsia para parar sangramento.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade – A leishmaniose é uma doença relacionada a reação do corpo contra a infecção pela *Leishmania*. O conhecimento das reações do corpo pode contribuir não somente pra a compreensão da doença, mas também para o desenvolvimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose. Entretanto, sua participação no estudo não trará nenhum benefício direto a você.

Custos – Você não terá nenhum custo e não receberá pagamento pela sua participação no estudo.

Esclarecimento – Caso você precise de esclarecimentos sobre o estudo ou precise de atendimento médico, você pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho Filho, Dr. Paulo Machado ou Dr. Luiz Henrique Guimarães.

Se você tiver qualquer pergunta sobre seus direitos como um sujeito da pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (endereço no início deste consentimento informado), número de telefone: 71-3203.2740.

Consentimento – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste formulário será entregue para você guardar.

Assinatura do Participante Data Hora

Assinatura do Pesquisador Data Hora

Assinatura da Testemunha Data Hora

ANEXO V.

Normas para elaboração do artigo da revista *The Journal of Immunology*



Manuscript Preparation

General Guidelines

A 12-point serif font, preferably Times New Roman, is required. Do not use compressed type format. Double-space entire manuscript. Each of the following components should begin on a separate page:

1. The *Title Page* must include the full title; a running title (not to exceed 60 characters); each author's full name as it should be published (first name, middle initial, last name) and the affiliations of all authors and their institutions, departments, or organizations (use the following symbols in this order to designate authors' affiliations: *, †, ‡, §, ¶, ||, #, **, ††, ‡‡, §§, ¶¶, || ||, ##). List the phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author on the title page. (See the [Submit Online](#) section for information about the corresponding author designation during submission and peer review.)
2. The *Abstract* must be 250 words or less for Full-Length type manuscripts. Reference citations should not be included in the *Abstract*. The species of animals or species of origin of cells used in the manuscript must be clearly stated in the *Abstract*. Please ensure that the final few sentences (50 words or less) of the *Abstract* provide a succinct summary of the main point of the paper.
3. The *Introduction*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Discussion* sections should begin on separate pages in that order. Do not combine the *Results* and *Discussion* sections for Full-Length papers.
 - For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.
 - Authors are encouraged to include the Minimal Information About T cell Assays ([MIATA](#)) in

the *Methods*, the figure legend or elsewhere as appropriate.

4. *Acknowledgments* appear immediately after the *Discussion* and before *References*.
5. *Grant support* must NOT be included in the *Acknowledgments* but should be cited as a footnote to the title. All funding sources must be disclosed and will be published as a footnote to the title; anonymous or pseudonymous funders are not permitted.
6. *References* must be numbered as they appear in the text. All authors must be listed for each reference. If citations are included in tables or in figure legends, they must be numbered according to the position of citation of the table or figure in the text. Only published papers and papers in press may be included in the *References*. In press articles, i.e., papers not yet published, must be submitted as online attachments in PDF format at the time of article submission. NOTE: Do NOT submit as attachment papers that are already published, e.g., manuscripts published ahead of print. Such papers must be incorporated into the *References* and cited with their DOI numbers and year of publication. Citations of "manuscripts in preparation," "unpublished observations," and "personal communications" must appear parenthetically in the text. Manuscripts "submitted for publication" (i.e., not yet accepted) also are mentioned parenthetically in the text. Written approval by the persons cited in personal communications must accompany the manuscript unless they are also authors of the manuscript submitted to *The JI*.

Format for references:

- **Periodicals:** Wells, A. D., M. C. Walsh, D. Sankaran, and L. A. Turka. 2000. T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division. *J. Immunol.*165: 2432–2443.
- **Books:** McIntyre, T. M., and W. Strober. 1999. Gut-associated lymphoid tissue: regulation of IgA B-cell development. In *Mucosal Immunology*, 2nd ed. P. L. Ogra, J. Mestecky, E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, eds. Academic Press, San Diego, CA. p. 319–356.

- **Articles published ahead of print:** Fraser, D.A., A. K. Laust, E. L. Nelson, and A. J. Tenner. 2009. C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* doi:10.4049/jimmunol.0902232.

7. *Footnotes* should be used to designate the source of support, new or special abbreviations used, correspondence address, current address, etc. Footnotes should be numbered consecutively and will appear on the title page, but for submission are grouped together and placed on a separate page between the *References* and the *Figure Legends*.
8. *Abbreviations* that may be used without definition are provided below. Spell out nonstandard abbreviations used less than three times. Nonstandard abbreviations used three or more times must be defined in a footnote. Abbreviations and their definitions must be consistent throughout the text.
The abbreviations listed below are used without definition in articles published in *The JI*. The form may be used for both singular and plural, or made plural with "s" at the author's option. The list of standard abbreviations is published in the first issue of each volume.
9. *Tables* must be numbered with Roman numerals in order of appearance in the text. All tables must have a title. Table legends are prepared as footnotes to the table and are included with the table. Tables must be in DOC file format. Each table should be submitted as a separate file.
10. *Figure legends* must be numbered with Arabic numerals in order of appearance in the text and should include a short title after the figure number. Where possible, symbols and patterns used to distinguish data should be defined in a key placed within the graphic rather than in the figure legend. All figure legends must specify the number of times each experiment was independently performed, as well as the number of animals or replicates in each experimental group. For flow cytometry experiments, authors should specify the gating strategies in the *Methods* or in the figure legend.
11. *Figures*: At initial submission, please submit low resolution files of the smallest possible file size that will convey the needed

information. Smaller files can be downloaded more quickly by reviewers and will hasten the review process. Alternately, single PDF of text plus figures may be submitted at initial submission. At submission of a revised manuscript, high-resolution figures that meet the following specifications must be submitted. For more information, see [GUIDELINES](#) and [TIPS](#).

- *Color*: Color figures must be in the RGB color space.
- *File Sizes*: Figure files should not exceed 10 MB (average size is about 2 MB).
- *Image Sizes*: Figures should be submitted in final print publication size (printed 1:1). Figures may be published in print in one of two formats: single-column (width from 3.37 to 8.23 cm) or double-column (width from 12.65 to 17.1 cm). The single-column format is preferred. Unless the file size is too large, multi-panel figures should be submitted as a single file.
- *Text and Lines*: Text in figures must be 6-8 points in size, except for single letter markers, which may be 12 points. Helvetica or Arial should be used for all figure text (except for the use of symbols). Line widths must be greater than one point thick or they will not be visible on the PDF version of the article.
- *Numbering*: Figures must be numbered as they appear in the text.
- *File Format*: Figures should be in **TIFF** (better for halftone art e.g., blots, photographs) **EPS** (better for line art or monochrome art, i.e., anything that involves sharply delineated lines), or **PDF** format. PowerPoint files are not suitable quality, as their resolution is too low for print. Please click [here](#) for detailed instructions on converting PowerPoint files to TIFF files.

12. *Digital Images*: All images submitted to *The Journal of Immunology* must accurately represent the original data. Original data (digital files, autoradiographs, films, etc.) for all experiments should be fully annotated, secured, and retrievable. The *original* image file (raw data file) should be kept in an

unprocessed and non-compressed file *format*. Figures that are compiled into multi-figure panels should be kept individually.

Although manipulation of images should be kept to an absolute minimum, there are some circumstances when manipulations are necessary. If, however, the quality of an image is too poor to clearly convey the conclusion, the experiment should be repeated.

- *Collecting images*: If multiple images are compared to one another, collect each image in the same manner. Any post-collection processing should be applied in a uniform manner to all images. If differences in collection/post-collection are necessary, these need to be described in the legend or methods section.
- *Brightness and Contrast*: If the brightness or contrast of an image needs minor adjustment, adjustments must be applied to the **entire** image and must not obscure or eliminate any information. Significant adjustments are not recommended. Always note any adjustment in the legend or methods section.
- *Cloning Tools*: Images should not be “airbrushed” (with Clone Stamp Tool/Clone Brush) to remove “blemishes”. Do not use cloning tools to insert something into an image from elsewhere.
- *Gels/Blots*: All gels should contain a positive and a negative control, and a set of molecular weight markers. For Western blots, control panels (actin, GAPDH, etc.) should come from a stripped and re-probed membrane of the experimental blot shown. If this is not possible, the control blots should be derived from the same samples and this should be indicated in the figure legend.
- *Cropping*: Conservative cropping of gels and blots to improve clarity and conciseness may be permitted if the following points are observed:
 - important bands must be retained

- at least several band widths should be retained above and below the cropped band
- cropping must be noted in the legend
- band(s) of interest must be clearly labeled
- molecular weight marker positions should be shown in all gels/blots
- *Splicing*: Occasionally, images are spliced to rearrange the order of samples for the sake of presentation, such as those in a Western blot. If splicing of data from a single experiment is necessary, draw contrasting (black or white) lines to indicate where the images were joined and state the manipulation in the legend. It would be preferable to re-run the gel so that the order is correct. Images from different experiments should not be spliced to form a new single image.

Cover Art: Cover art is selected from images in accepted articles and changes with each issue of *The JI*. Authors are encouraged to submit color figures with their manuscripts for possible use as cover illustrations. If an image is selected as cover art, the file must have a resolution of at least 300 dpi at a size of 8.5" x 11".

Depositing In Public Databases

High-resolution structural data: Any paper submitted to *The JI* that contains new high-resolution structural data requires an accession number from the [Protein Data Bank](#) and assurance that unrestricted release will occur at or before the time of publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Nucleotide sequences: Sequences of nucleotides or amino acids longer than 50 bases/residues should not be presented in the text or in table form, but rather should be submitted as a publication-quality figure. Original nucleotide sequences, and determined nucleotide sequences encoding reported amino acid sequences, described in the manuscript must be submitted to [GenBank](#) or [EMBL DataLibrary](#) at the time of manuscript submission. An accession number and sequence availability are required at the time of publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Microarray Data: *The JI* will not publish descriptive manuscripts that report microarray data, unless such information can be considered of unusual immunological significance and/or include functional experiments that provide novel insight into mechanism. As with other scientific approaches, current experimental, quantitation, verification, and statistical analyses are expected. Microarray experiments should be Minimum Information About a Microarray Experiment ([MIAME](#)) compliant. Whereas limited online space may be available for supplemental tables associated with the manuscript, complete microarray data must be deposited in the appropriate public database (e.g., [GEO](#), [ArrayExpress](#), or [CIBEX](#)), and must be accessible without restriction from the date of publication. An entry name or accession number must be included in the

paper before publication. The accession number should be accompanied by the Website address of the databank.

Estimating Manuscript Length: One printed page in *The JI* contains approximately 8,000 characters, including spaces. Thus, an 8 page, Full-Length article would contain approximately 64,000 characters. Each line in a table occupies about 60 characters for a single-column table (120 characters for a double-column table). Figures occupy about 180 characters per centimeter height for single-column figures (360 characters for double-column figures). Determine the total character count for the text of your manuscript and add the character-equivalents for the tables and figures. This will provide a reasonable estimate for the printed length of a manuscript.

Human And Animal Use: All studies involving human subjects must be conducted in accordance with the guidelines of the World Medical Association's Declaration of Helsinki (most recent revision). All animal studies must be performed in compliance with the U.S. Department of Health and Human Services Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (or otherwise equivalent guidelines). A statement that human and/or animal studies have been reviewed and approved by an appropriate institutional review committee must be included in the *Materials and Methods* section of the manuscript.

Style Guide

General style conventions: In general, *The JI* follows *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, seventh edition, published by the Council of Science Editors, Inc., in instances where style issues are not directly addressed.

Abbreviations for references: [PubMed](#) is the primary source for journal name abbreviations.

Nomenclature:

1. **Allergen nomenclature:** Nomenclature for allergens should be assigned in cooperation with the IUIS Allergen Sub-Committee. Authors of accepted manuscripts that describe novel allergens will be requested to complete a brief standard form available at [IUIS Allergen Nomenclature](#).
2. **CD nomenclature:** For the purpose of consistency, *The JI* will follow CD nomenclature. For murine molecules, *The JI* will follow the nomenclature previously published ([J. Immunol. 160: 3861-3868, 1998](#)). For human molecules, standard CD nomenclature will be followed as updated ([J. Immunol. 168: 2083-2086, 2002](#)). See also [HCDM](#)
3. **Chemical names:** The *JI* uses [The Merck Index](#) and the [IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature-Chemical Abstracts](#) as the primary references for proper spelling and style of chemical names.
4. **Chemokine/chemokine receptor nomenclature:** The systematic name for chemokines and chemokine receptors should be used. The original name may be given in parenthesis if desired. See *Cytokine* 21:48-9, 2003.

5. [Enzyme Nomenclature](#) is *The JI* source for style and spelling of enzyme names.
6. *Gene nomenclature*: The [HUGO guidelines](#) for gene nomenclature may be used for naming human genes. [Mouse Genome Informatics](#) is a reference source for naming mouse genes.
7. *Genetic nomenclature for mice*: *The JI* uses the revisions for standardized genetic nomenclature for mice published periodically in *Mouse Genome*. A current listing of inbred strains of mice and rats is available at [Mouse Genome Informatics](#). Authors are encouraged to deposit their mapping data with the Mouse Genome Database (MGD) before publication and to include the assigned MGD accession numbers in their manuscripts. Data may be submitted electronically by e-mail. Information about electronic submission of datasets can be obtained at the [Data and Nomenclature Submissions](#) page. Gene symbols should be reserved with MGD in advance of publication. An [electronic nomenclature submission form](#) is available from the MGD Web site.
8. *HLA nomenclature*: HLA nomenclature is updated periodically by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. A recent reference is *Hum. Immunol. 64: 919-20, 2003*. Annual comprehensive revisions are published in *Human Immunology*, usually in the spring. See also: [EMBL-EBI](#)

Supplemental Materials

Supplemental Data:

- Supporting data that are not essential to understanding the material presented in the manuscript may be submitted with the original paper for peer review; however, the print version of the paper must stand on its own without the Supplemental Data.
- Supplemental material is primarily intended for short videos or large tables, large sequence alignments, or large data sets. Additional supplemental figures and tables that support the interpretation and conclusions drawn in the manuscript may, however, also be submitted for review with the manuscript.
- Supplemental Data must be submitted as separate files from the rest of the manuscript during the online submission; select "Supplemental Data" as the "File Type" when uploading the files.
- For Cutting Edge manuscripts, no more than two supplemental figures and/or tables may be submitted; for Full-Length

manuscripts, no more than four supplemental figures and/or tables may be submitted.

- *Legends* or short explanations must accompany all supplemental figures; no other supplementary text is permitted.

Videos must be 320 x 480 pixels or smaller for best viewing within a browser. Videos must be no longer than 30 seconds and under 10 MB, with no sound or voice-over. Submit videos in MPG or QuickTime format. Change QuickTime file extensions to ".mov" so that Web browsers will recognize the file type and play the movie. Compress videos as much as possible to help control file size. Name videos by order of citation appearance (e.g., video1.mov). Select "Video" as the "File Type" when uploading the files during online submission. Authors will be notified if problems exist with videos as submitted and will be asked to take responsibility for modifications. No editing will be done to videos at the Editorial Office.

Links to the Supplemental Material will appear in two places in the online journal: in the Table of Contents and in the information box associated with the first page of the full-text article. There will not be any links in the body of the article. In the printed paper, supplemental material will be footnoted the first time mentioned: "The online version of this article contains supplemental material."

Supplemental Materials are posted online as provided by the author.

There is a publication charge of \$75 per supplemental figure or table.

Web Links In Submitted Manuscripts: Links to Websites are permitted only if the information contained on the Website is not essential to the understanding and assessment of the manuscript or to the ability to repeat the experiments described in the paper. Web links will not be checked after submission for correctness or functionality; it is the responsibility of the authors to ensure that the web link is correct.

Cutting Edge Manuscripts

Manuscripts submitted to the Cutting Edge section should conform to the [General Guidelines](#) for Full-Length manuscripts as well as the additional guidelines below:

1. Cutting Edge articles, including figures and references, *must fit within 4 journal pages*. See [Estimating Manuscript Length](#) for how to estimate the size of figures and tables and limit the text accordingly. One printed page in *The JI* contains approximately 8,000 characters, including spaces. Thus, a 4-page Cutting Edge article would contain approximately 32,000 characters.
2. The *Abstract* is limited to 150 words.
3. The *Materials and Methods* section may be sharply limited but should be sufficient to allow the evaluation of results and conclusions.
4. Authors may combine the *Results* and *Discussion* sections.