

I. RESUMO

ESTUDO DAS METALOPROTEINASES 1 E 3 EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) devido à infecção por *Leishmania braziliensis* é caracterizada por níveis elevados de TNF, IFN- γ e infiltrado celular composto por macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Além destas células, enzimas como metaloproteinases (MMPs) podem participar da formação da lesão por sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (MEC). A atividade destas MMPs é extremamente regulada e, sua ação é controlada pelo inibidor TIMP.

Objetivo: Avaliar a produção de MMP-1 e MMP-3 na leishmaniose cutânea e sua relação com a gravidade da doença. **Metodologia:** Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas de indivíduos sadios (IS) e de pacientes com LC para determinar a frequência de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, sub-populações de monócitos e a expressão de CD147 por citometria de fluxo. A produção de MMP-1 e MMP-3 em CMSP na presença ou ausência de SLA, anti-IFN- γ , anti-TNF, anti-IL-6 e anti-IL-1 β e em sobrenadantes de biópsia foram determinados por ELISA. **Resultados:** A produção de MMP-3 foi maior na cultura das células de pacientes com LC estimuladas com SLA quando comparada com IS, no entanto não tenha sido observada diferença na produção de MMP-1 entre os grupos. Após neutralização de TNF, IL-6, IL-1 β e IFN- γ foi observado aumento de MMP-1 embora a produção de MMP-3 seja modulada na presença destes bloqueadores nos sobrenadantes de pacientes com LC. Em relação à gravidade da doença, foi observada uma correlação negativa entre a produção de MMP-1 e MMP-3 com o tamanho da lesão de pacientes com LC. A expressão de CD147 foi mais evidente nos linfócitos TCD8⁺ de pacientes com LC em relação aos IS. **Conclusão:** Estas

observações sugerem que a MMP-1 influencia na produção de citocinas inflamatórias, entretanto há necessidade de maiores estudos para determinar se seu envolvimento está direcionado para o remodelamento ou abertura da lesão observada na LC.

Palavra-chave: MMP-1, MMP-3, Citocinas, Leishmania, Inibidor CD147

I. SUMMARY

STUDY OF METALLOPROTEINASES 1 AND 3 IN PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Introduction. Cutaneous leishmaniasis (LC) due to infection with *Leishmania braziliensis* is characterized by elevated levels of TNF, IFN- γ and cellular infiltrate composed of macrophages, monocytes, dendritic cells and CD4+ and CD8+ T lymphocytes. In addition to these cells, enzymes such as metalloproteinases (MMPs) may participate in lesion formation by their ability to degrade extracellular matrix components (ECM). The activity of these MMPs is extremely regulated, and TIMP inhibitor realizes that control. **Objective.** To evaluate contribution of the metalloproteinases-1 and 3 in pathology of cutaneous leishmaniasis. **Material and Methods.** PBMC were obtained from healthy control and patients with cutaneous leishmaniasis and SLA stimulated, serum and culture biopsy were also acquired to evaluate the levels of MMP1, MMP3, TIMP-1, TNF, IL-6, IL-1, IL-10 and IFN- γ by the ELISA technique. Monocytes and lymphocytes from healthy control and CL patients were analyzed ex-vivo staining with CD14, CD4 and CD8 for the expression of CD147. **Results.** MMP-3 production was higher in cell culture of SLA-stimulated LC patients compared to HS, however, no difference in MMP-1 production between groups was observed. After neutralization of TNF, IL-6, IL-1 β and IFN- γ , an increase of MMP-1 was observed although the production of MMP-3 was modulated in the presence of these blockers in the supernatants of patients with CL. Regarding the severity of the disease, a negative correlation was observed between the production of MMP-1 and MMP-3 with the lesion size of patients with CL. The expression of CD147 was more evident on the CD8 + T lymphocytes of patients with CL in relation to HS. **Conclusion.** These results suggest that MMP-1 influences the

production of inflammatory cytokines, however, there is a need for further studies to determine whether its involvement is directed at the remodeling or opening of the lesion observed in CL.

Keywords: MMP-1, MMP-3, Cytokines, Leishmania, CD147 Inhibitor.

Figura 2. Produção de MMP-1, MMP-3 e do inibidor TIMP-1 em biópsias de pacientes com Leishmaniose Cutânea e Indivíduos Sadios.

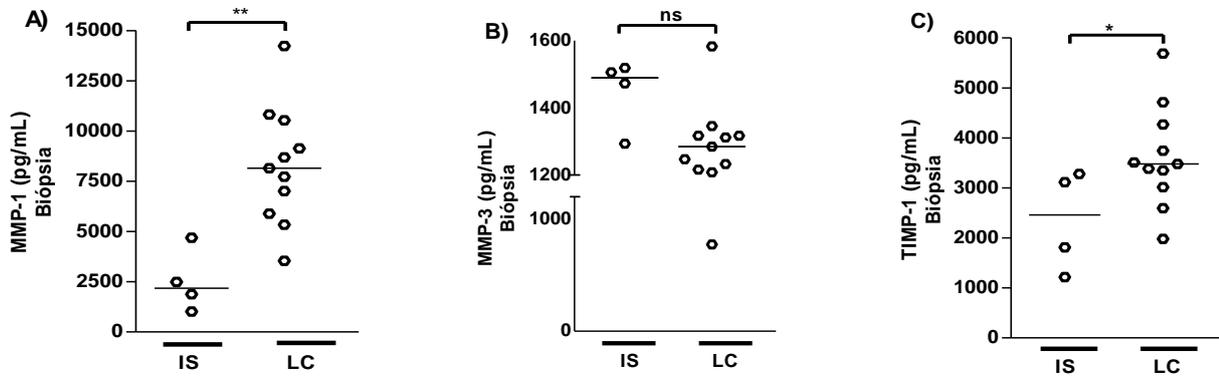


Figura 2. Produção de MMP-1, MMP-3 e TIMP-1 em biópsia de pacientes com Leishmaniose Cutânea. Foram determinados por ELISA os níveis de MMP-1(A), MMP-3(B) e TIMP-1(C) em sobrenadantes de cultura de biópsia de pacientes com LC (N=11) e de biópsia de indivíduos sadios (IS) (N=4). Os resultados foram apresentados em pg/mL. Teste U de Mann-Whitney *P<0.05, **P<0.01.

Figura 3. Participação de TNF e IFN- γ na produção de MMP-1 e MMP-3 em pacientes com Leishmaniose Cutânea.

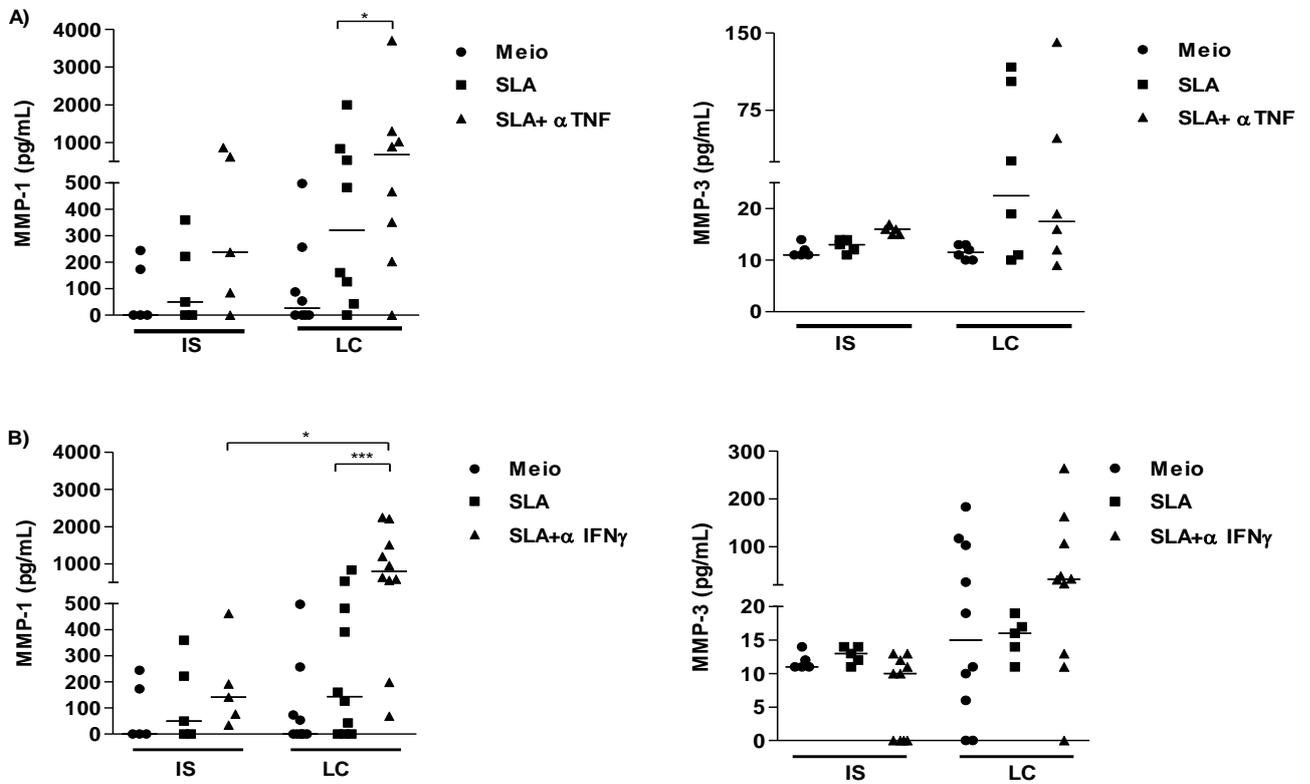


Figura 3. Produção de MMP-1 e MMP-3 em pacientes com LC. CMSP de pacientes com LC (n = 11) e IS (n = 05) foram cultivadas em meio ou estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (5ug/mL) com anti-TNF(10ug/mL) e com anti-IFN γ (10ug/mL) por 72 horas e as MMPs presentes no sobrenadante das culturas foram medidas por ELISA. Os resultados foram apresentados em pg/ml. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns e teste de Willcoxon *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figura 4. Participação de IL-1 β e IL-6 na produção de MMP-1 e MMP-3 em pacientes com Leishmaniose Cutânea.

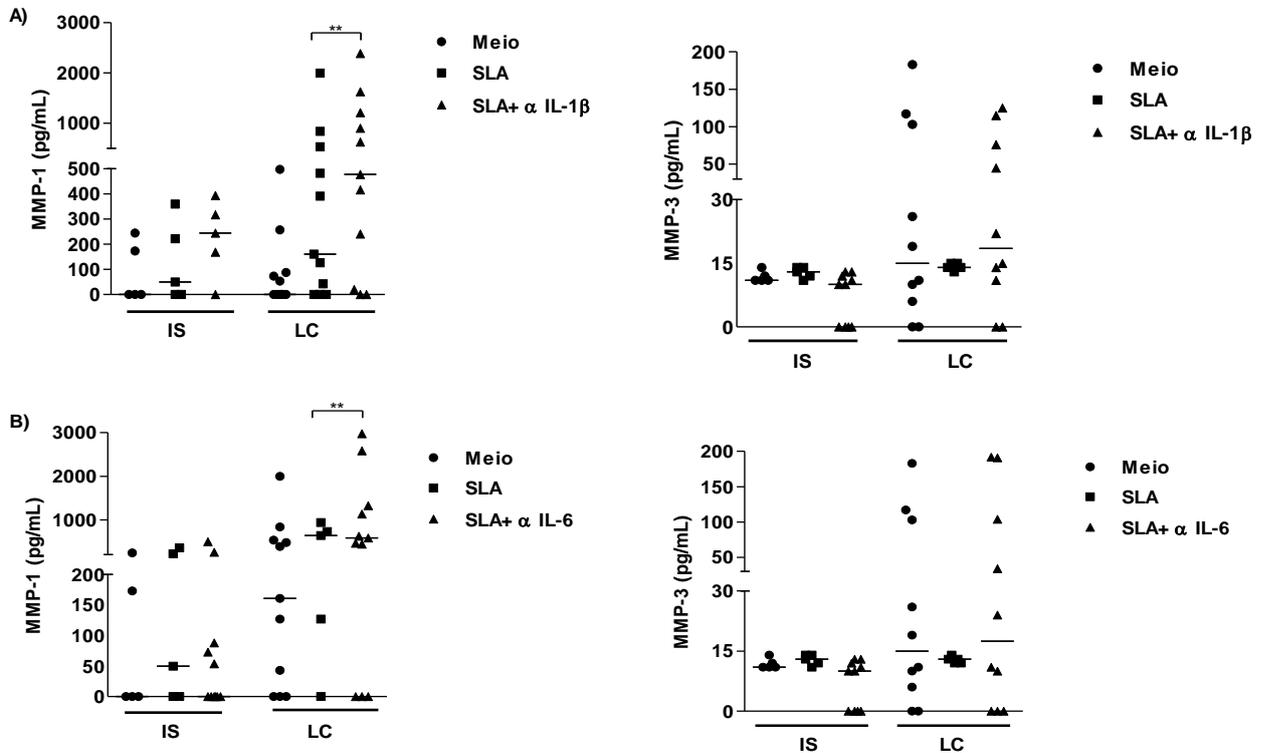


Figura 4. Produção de MMP-1 e MMP-3 em pacientes com LC. CMSP de pacientes com LC (N = 11) e IS (N = 05) foram cultivadas em meio ou estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (5ug/mL) com anti- IL-1 β (10ug/mL) e anti- IL-6 (10ug/mL) por 72 horas e as MMPs presentes no sobrenadante das culturas foram medidas por ELISA. Os resultados foram apresentados em pg/mL. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns e teste de Willcoxon * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Figura 5. Expressão de CD147 nas sub-populações de monócitos clássicos e Intermediários de pacientes com Leishmaniose Cutânea e indivíduos sadios.

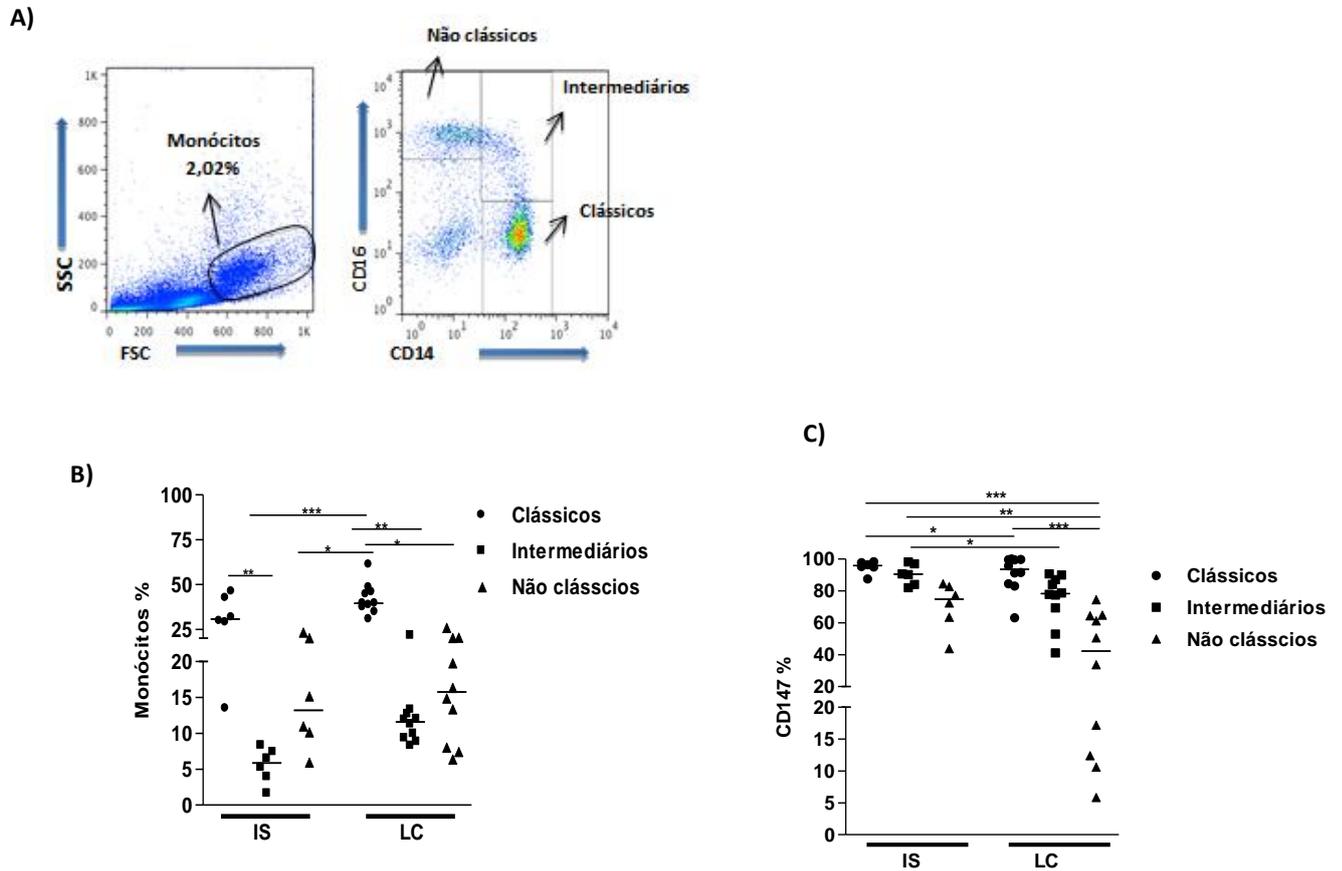


Figura 5. Análise *ex-vivo* da expressão de CD147 nas subpopulações de monócitos de pacientes com LC. (A) Plot representativo das subpopulações de monócitos em um indivíduo com leishmaniose cutânea identificando-as como Clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), Intermediários (CD14⁺CD16⁺) e Não-Clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). **(B)** Frequência das subpopulações de monócitos de Indivíduos sadios (N=6) e pacientes com leishmaniose cutânea (N=11). **(C)** Frequência de CD147 nas sub-populações de monócitos em IS e pacientes com LC, analisadas por citometria de fluxo. Os testes não-paramétricos: Kruskal-Wallis e teste post Dunns Kruskal-Wallis e teste post Dunns foi utilizado para comparar três variáveis contínuas e Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre grupos * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Figura 6. Expressão de CD147 em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos saudáveis.

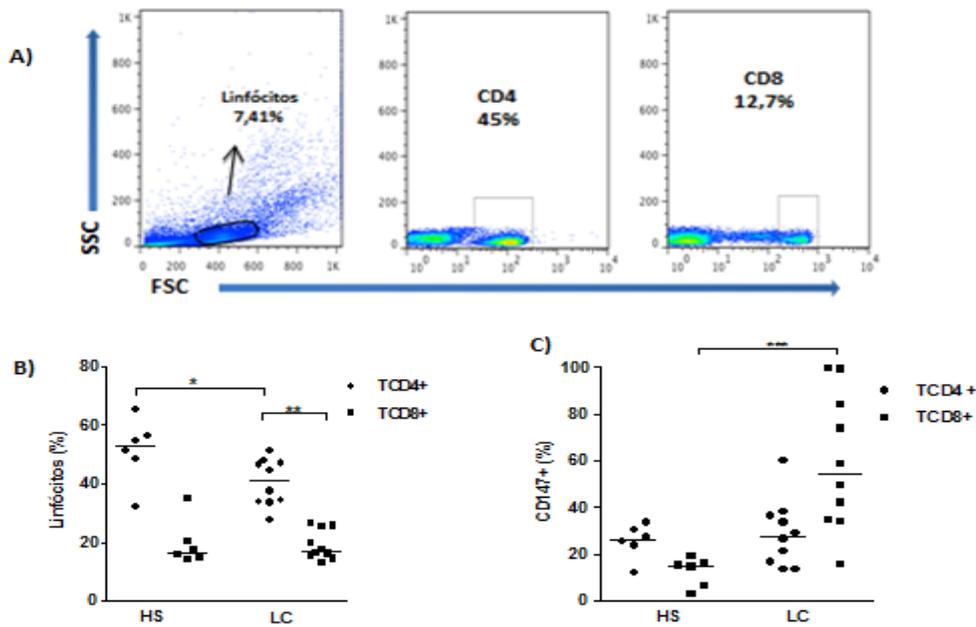


Figura 6. Análise *ex-vivo* da expressão de CD147 em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de pacientes com LC. (A) Plot representativo da população de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de um paciente com leishmaniose cutânea. (B) Frequência de linfócito TCD4⁺ e TCD8⁺ de Indivíduos saudáveis (IS) (N=6) e pacientes com leishmaniose cutânea (LC) (N=11). (C) Frequência de CD147 na população de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de IS e pacientes com LC, analisadas por citometria de fluxo. Os testes não-paramétricos: Kruskal-Wallis e teste post DunnsKruskal-Wallis e teste post Dunns foi utilizado para comparar três variáveis contínuas e Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre grupos * p<0.05, ** p<0.01, * p<0.001.**

Figura 7. Correlação entre a produção de MMP-1 e MMP-3 em sobrenadantes de CMSP e biópsia com o maior tamanho da lesão de pacientes com LC.

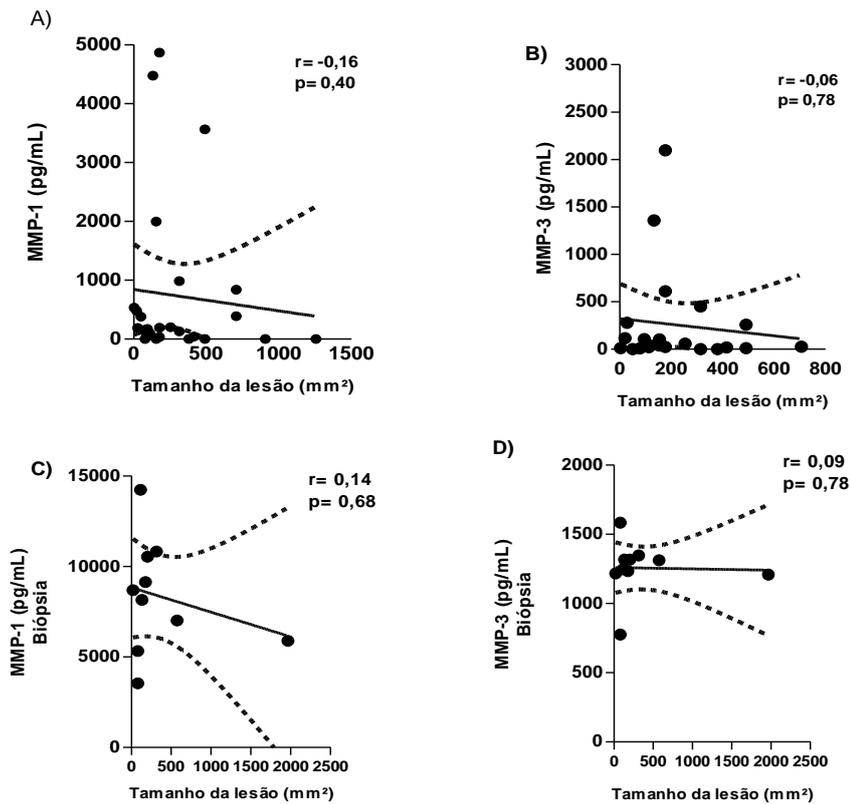


Figura 7. Correlação entre a produção de MMP-1 e MMP-3 em CMSP e biópsia com o maior tamanho da lesão de pacientes com LC. Os dados de CMSP foram obtidos de 27 pacientes com LC (figura 7A e 7B) e 10 biópsias de pacientes com LC (figura 7C e 7D). Valores de MMP-1 e MMP-3 são expressos em pg/mL. A área do maior tamanho da lesão foi calculada pela fórmula $A = \pi \cdot r^2$. Dados analisados por correlação de Spearman. Significância estatística com $P < 0,05$.

