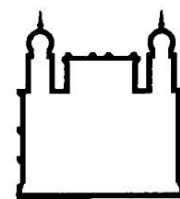




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DA INFLAMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

CIBELE TEREZA DEOLINDA MACHADO ORGE

**Salvador - Bahia
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**PAPEL DA INFLAMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

CIBELE TEREZA DEOLINDA MACHADO ORGE

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri

Co-orientador: Dr. Juliana Menezes

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia
2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

O68p Orge, Cibele Tereza Deolinda Machado.
Papel da inflamação e degradação da matriz extracelular na Leishmaniose Cutânea localizada. / Cibele Tereza Deolinda Machado Orge. - 2020.
52 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha, Laboratório de
Enfermidades Infecciosas por Vetores.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Instituto Gonçalo Moniz,
Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Inflamação. 4. Matriz
Extracelular. 5. Metaloproteases. I. Título.

CDU 616.993.161

**“PAPEL DA INFLAMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR NA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA”.**

Cibele Tereza Deolinda Machado Orge

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 26 de maio de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Deboraci Brito Prates

Dra. Deboraci Brito Prates
Professora
UFBA

Léa Castellucci

Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci
Professora
UFBA

Antonio Ricardo Khouri Cunha

Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*À todos os animais, sem os quais, nada deste
trabalho seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela vida, pelo apoio e amor incondicional. Sem os quais nada faria sentido.

Ao Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ-BA) e ao Programa de Pós-graduação em Patologia (PgPAT/FIOCRUZ-BA) por disponibilizar todo apoio e estrutura, assim como todos os funcionários pelo profissionalismo e apoio no decorrer do curso.

Ao meu orientador **Dr. Ricardo Khouri** pela orientação, paciência, confiança e pela oportunidade de aprender tanto e de tudo um pouco durante esses quatro anos de convivência.

À minha co-orientadora **Dra. Juliana Menezes** pela paciência, apoio e disponibilidade. E, à sua aluna **Yasmin Luz** pela contribuição nas etapas experimentais.

Ao Biotério e em especial a **Valdomiro Moitinho**, pelo extenso e crucial trabalho em toda a parte experimental e, acima de tudo, pelo apoio e amizade durante todo meu percurso.

Ao **Dr. Washington dos Santos**, pela paciência, ensinamentos, disponibilidade e toda a análise histopatológica presente neste trabalho.

À **Dra. Viviane Boaventura**, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos e suporte na análise e aquisição das fotografias de microscopia óptica.

À **Cristina Mota** por todo apoio e trabalho técnico na confecção e preparo das lâminas histopatológicas.

À biblioteca do IGM, em especial à **Martha Silveira** e **Ana Maria Fiscina**, pela disponibilidade e correção deste trabalho.

À toda plataforma de Microscopia, em especial, à **Dr. Claudio Figueira**, **Dra. Adriana Rangel** e **Arlene Lessa**, pelo grande suporte, estrutura, disponibilidade e todos os ensinamentos.

Aos colegas do LIB e em especial à **Hayna Malta** e **Jéssica Rebouças**, por todo o apoio nas técnicas quantitativas por luminex.

Ao meu grupo de pesquisa carinhosamente apelidado de “**Khouriosos**”, por todos os aprendizados, encontros científicos/não científicos e suporte nas etapas experimentais sempre que necessário. Que nossa curiosidade e amor pela ciência prevaleça.

À todos os meus amigos que participaram direta ou indiretamente neste percurso, em especial, à **Laise de Moraes**, **Nina Libório** e **Vinícius Pires**. Obrigada pela escuta atenciosa, ombro amigo e apoio infinito.

À **Paçoca**, pelo amor incondicional, companhia fiel e preservação da minha saúde mental nestes tempos de COVID-19.

ORGE, Cibele Tereza Deolinda Machado. Papel da inflamação e degradação da matriz extracelular na Leishmaniose Cutânea localizada. 2020. 52 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública de caráter endêmico em cerca de 98 países e territórios, afeta 12 milhões de pessoas em todo o mundo e cresce a uma taxa de 1,5 milhão de novos casos por ano. No Brasil, a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) é uma das patologias dermatológicas que necessita de atenção, além de ser uma doença com alta morbidade, possuindo um caráter social estigmatizante devido a ocorrência de lesões desfigurantes. Durante a formação da lesão cutânea o processo inflamatório estimula a produção de metaloproteases e outras enzimas que estão relacionadas a degradação da matriz extracelular. Essa degradação possui papel fundamental numa reepitelização/cicatrização mais rápida do tecido. **OBJETIVO:** Avaliar o papel do processo inflamatório e proteases na degradação e formação da matriz extracelular no linfonodo e nas lesões de orelha no modelo murino Balb/c infectado com *Leishmania braziliensis*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Analisamos amostras de lesão de orelha e linfonodo através de microscopia ótica (histopatologia), microscopia eletrônica de transmissão, imunoensaio por técnica de luminex (quantificação de citocinas e metaloproteases) e ensaio de degradação das matrizes tridimensionais fluorescentes, semanalmente, até a cicatrização da lesão (70 dias). **RESULTADOS:** Através do acompanhamento macroscópico, histopatológico e proteico da orelha e do linfonodo de drenagem, caracterizamos e descrevemos o processo inflamatório celular e de organização da matriz extracelular. Constatamos a presença de amastigotas de *Leishmania braziliensis* desde o sétimo dia de infecção até a cicatrização da lesão (70 dias) assim como a formação de um arcabouço (matriz extracelular) no dia 49 até o dia 63 de infecção acompanhado do aumento dos níveis metaloproteases, sem ressurgimento da lesão. Indicando também um papel importante das metaloproteases no processo de reepitelização. **CONCLUSÕES:** Nosso estudo possibilitou a caracterização e quantificação da degradação da matriz extracelular, das metaloproteases e avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo murino de LCL. Entretanto, mais estudos são necessários para destrinchar estes perfis.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea, *L. braziliensis*, Inflamação, Matriz Extracelular, Metaloproteases.

ORGE, Cibele Tereza Deolinda Machado. Role of inflammation and degradation of extracellular matrix in Cutaneous Leishmaniasis. 2020. 52 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.19.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis is anthroponoses considered a major public health problem, endemic in about 98 countries and territories, affecting 12 million people worldwide and growing at the rate of 1.5 million new cases per year. In Brazil, LCL is one of the dermatological pathologies that needs attention, in addition to being a disease with high morbidity, it also has a social stigmatizing character due to the occurrence of disfiguring lesions. During the formation of the skin lesion, the inflammatory process stimulates the production of metalloproteases and other enzymes that are related to degradation of the extracellular matrix. This degradation plays a fundamental role in faster tissue re-epithelization/healing. **AIM:** To evaluate the role of the inflammatory process and proteases in the degradation and formation of the extracellular matrix, in order to understand their impact on the formation of the lesion in the BALB/c murine model infected with *Leishmania braziliensis*. **METHODS:** We analyzed samples of ear and lymph node lesions using optical microscopy (histopathology), transmission electron microscopy, immunoassay using the luminex technique (quantification of cytokines and metalloproteases) and degradation assay of the three-dimensional fluorescent matrices, weekly, until full scar healing (70 days). **RESULTS:** Through macroscopic, histopathological and protein monitoring of the ear and drainage lymph node, we were able to characterize and describe the cellular inflammatory process and organization of the extracellular matrix. We observed the presence of *Leishmania braziliensis* amastigotes from the seventh day of infection to the healing of the lesion (70 days), as well as the formation of a scaffold (extracellular matrix) on day 49 through day 63 of infection accompanied by increased levels of metalloproteases, without resurgence of the lesion. Therefore, displaying an important role of metalloproteases in the re-epithelialization process. **CONCLUSION:** Our study made it possible to characterize and quantify the degradation of the extracellular matrix, metalloproteases and to evaluate the production of pro and anti-inflammatory cytokines in the murine model of LCL. However, further studies are needed to unravel these profiles.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, *L. braziliensis*, Inflammation, Extracellular Matrix, Metalloproteases.

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	17
Figura 2. Representação gráfica da espessura da lesão da orelha de camundongos Balb/C infectados por <i>L. braziliensis</i> ao decorrer do tempo (0 horas até 70 dias).....	28
Figura 3. Acompanhamento histopatológico do modelo de LCL murino ao longo do tempo. ...	32
Figura 4. Análise histopatológica da orelha no modelo murino de LCL do tempo 0h até 28 dias.	34
Figura 5. Análise histopatológica da orelha no modelo murino de LCL ao longo do tempo do tempo 35 dias até 70 dias.....	36
Figura 6. Análise histopatológica no modelo murino de LCL ao longo do tempo.	38
Figura 7. Dispersão da matriz extracelular e formação de arcabouço a partir dos 49 dias de infecção.	40
Figura 8. Perfil de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo de LCL murino ao longo do tempo.....	41
Figura 9. Perfil de expressão de metaloproteases no modelo de LCL murino ao longo do tempo.....	42
Figura 10. Avaliação da capacidade de degradação da matriz de células do linfonodo e da orelha no modelo murino de LCL.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EPM	Erro Padrão da Média
FN	Fibronectina
GAGs	Glicosaminoglicanos
GP63	Glicoproteína 63
HE	Hematoxilina-Eosina
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon Gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IQ	Intervalo Inter-Quartil
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
LCDA	Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LR	Leishmaniose recidivante
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
ME	Microscopia Eletrônica
MEC	Matriz extracelular
MMP-1	Metaloprotease de Matriz 1
MMP-12	Metaloprotease de Matriz 12
MMP-2	Metaloprotease de Matriz 2
MMP-3	Metaloprotease de Matriz 3
MMP-8	Metaloprotease de Matriz 8
MMP-9	Metaloprotease de Matriz 9
MMPs	Metaloproteases de Matriz

MO	Microscopia Óptica
NRS	Núcleos Regionais de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PGs	Proteoglicanos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	LEISHMANIOSES	16
1.1.1	Leishmaniose Tegumentar no Brasil	17
1.1.2	Caracterização clínica, imunopatológica e terapêutica da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) : A forma clínica mais prevalente da Leishmaniose Tegumentar no Brasil	18
1.1.3	Aspectos macroscópicos e histopatológicos da lesão cutânea na LCL	19
1.2	PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E METALOPROTEASES PARA A MORFOGÊNESE E HOMEOSTASE DA PELE	20
1.2.1	Componentes estruturais e regulatórios da matriz extracelular: estrutura, interações, funções	21
1.2.2	Papel das metaloproteases de matriz extracelular na leishmaniose cutânea localizada	23
2	JUSTIFICATIVA	25
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	COMITÊS DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	27
5.2	ANIMAIS	27
5.3	CULTURA DE PARASITOS	27
5.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	27
5.5	HISTOPATOLOGIA	28
5.6	EXTRAÇÃO PROTEICA.....	28
5.7	IMUNOENSAIO	29
5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	29
5.9	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DAS MATRIZES TRIDIMENSIONAIS FLUORESCENTES	30
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6	RESULTADOS	31
6.1	DESENVOLVIMENTO DE LESÃO ULCERADA AUTORESOLUTIVA EM CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM <i>L. braziliensis</i> NA DERME DA ORELHA	31

6.2	ACOMPANHAMENTO HISTOPATOLÓGICO DA LESÃO DA ORELHA NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO.....	32
6.3	ACOMPANHAMENTO HISTOPATOLÓGICO DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO	40
6.4	PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO	40
6.5	PERFIL DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEASES DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO.....	41
6.6	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE CÉLULAS DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO MURINO DE LCL AO LONGO DO TEMPO .	43
7	DISCUSSÃO	45
8	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública possuindo caráter endêmico em cerca de 98 países e territórios, afetando 12 milhões de pessoas em todo o mundo e crescendo a uma taxa de 1,5 milhão de novos casos por ano (WHO, 2017). São parasitoses causadas pela infecção por parasitos intracelulares que pertencem ao reino Protista, à família *Trypanosomatidae*, ao gênero *Leishmania* e são transmitidos por vetores flebotômicos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), dando início ao ciclo biológico da *Leishmania spp.* (Figura 1) (SACKS; KAMHAWI, 2001; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Além do homem, acomete diversas espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e silvestres (DANTAS-TORRES, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

Clinicamente, a leishmaniose pode ser classificada em duas formas principais: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV, mais conhecida como Calazar, é uma doença crônica, sistêmica e considerada a forma mais grave da leishmaniose. No Brasil, é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e atinge órgãos vitais como baço, fígado, medula óssea e linfonodos, com reflexo em vários sistemas do organismo (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; WHO, 2017). A LT, no Brasil, é causada pelas espécies do gênero e subgêneros *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*, sendo as três mais importantes a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Esta forma da doença acomete, principalmente, a pele dos indivíduos podendo atingir também a mucosa, indo desde lesão única até quadros generalizados (REITHINGER *et al.*, 2007).

Tanto a LV quanto a LT se encontram em franca expansão e em 2012 foram incluídas, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), entre as 10 doenças infecciosas prioritárias para implementação de medidas de controle (WHO, 2012; ALVAR *et al.*, 2012). A sua diversidade de agentes, de reservatórios, de vetores e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos da doença facilitou para que se tornassem um grave problema de saúde pública, com altos índices de morbidades, podendo levar ao óbito em casos não tratados (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; BRASIL, 2017). Por se tratar de uma doença que atinge principalmente países em desenvolvimento com populações mais pobres e vulneráveis, as leishmanioses são enquadradas como doenças tropicais negligenciadas (BRASIL, 2010).

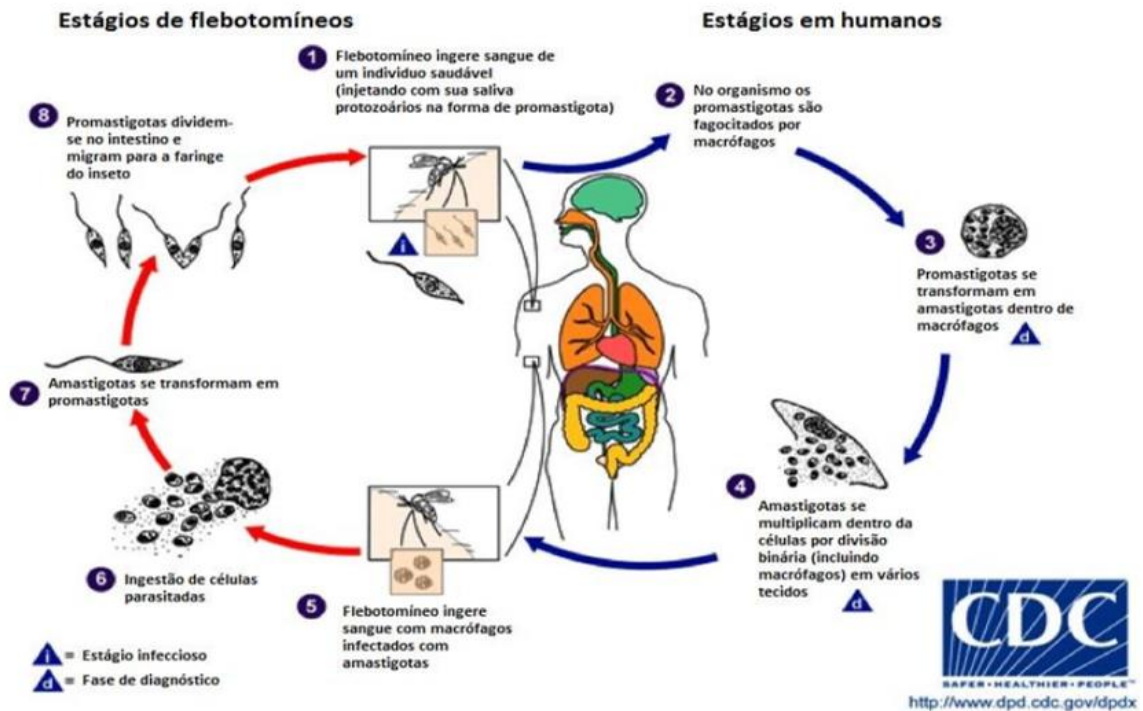


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

A transmissão ocorre no momento em que o vetor infectado, ao realizar a hematofagia, inocula as formas promastigotas num hospedeiro susceptível (1). No organismo do hospedeiro, as formas promastigotas do parasito serão fagocitadas por células de defesa imune (2) como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (HANDMAN; BULLEN, 2002; BEATTIE; KAYE, 2011). Uma vez internalizadas, os parasitos necessitam se transformar na forma amastigota para sobreviver (3), realizando sucessivas divisões binárias dentro dos fagócitos até a ruptura celular, sendo imediatamente fagocitados por outras células de defesa (4) (COURRET *et al.*, 2002). As células infectadas são transportadas pela corrente sanguínea para vários órgãos, inclusive para a pele, onde estarão sujeitos a ingestão pelos vetores (5-6) (HANDMAN; BULLEN, 2002; REITHINGER *et al.*, 2007; RIBEIRO, 1995). No trato digestivo do vetor as formas promastigotas dividem-se e migram para a faringe do inseto (8) (SACKS; PERKINS, 1984). No novo repasto sanguíneo do vetor infectado, um novo hospedeiro mamífero pode ser infectado, fechando o ciclo.

1.1.1 Leishmaniose tegumentar no Brasil

A LT tem ampla distribuição mundial e no continente americano há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. Do total de casos de 2017, 72,6% foram reportados pelo Brasil (17.526), Colômbia (7.764), Peru (6.631) e Nicarágua (4.343) (OPAS, 2019). No Brasil, possui uma taxa de incidência de 8,44 casos por 100.000 habitantes e um total de 17.528 casos registrados em 2017 (BRASIL, 2017). O Nordeste brasileiro, em 2015, apresentou 5.152 casos da doença, sendo ainda uma

preocupação para as autoridades sanitárias do país (OPAS, 2017). Na Bahia, a LT encontra-se dispersa, com existência de focos em 25 das 29 Regiões de Saúde (86,2%). As maiores incidências da enfermidade em 2016 estão nos Núcleos Regionais de Saúde (NRS) Sul, Oeste e Centro-Norte (SESAB/SUS, 2016).

1.1.2 Caracterização clínica, imunopatológica e terapêutica da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL): a forma clínica mais prevalente da Leishmaniose Tegumentar no Brasil

A interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, dependendo da intensidade e qualidade da mesma, constituem fatores importantes para a caracterização do desfecho clínico da doença, podendo evoluir para formas autolimitadas ou progressivas, por exemplo, dependendo do grau de gravidade (BITTENCOURT *et al.*, 1990; BARRAL *et al.*, 1995). Atualmente, os critérios mais utilizados para essa caracterização são as definições clínico-histopatológicas, considerando parâmetros como: o local da lesão, a resposta inflamatória e o nível de destruição tecidual (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; REITHINGER *et al.*, 2007). Desta maneira, é possível classificar a LT em cinco formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose recidivante (LR) e leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) (LAINSON; SHAW, 1998; COSTA *et al.*, 2009; PACE, 2014; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

No Brasil, a LCL é a forma com maior prevalência (BRASIL, 2017). Esta apresentação da leishmaniose envolve diversas espécies em sua etiologia, principalmente *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, e, com maior destaque, a *L. (V.) braziliensis* (REITHINGER *et al.*, 2007; ESPINOSA *et al.*, 2016). A lesão da LCL é caracterizada geralmente por pequenas pápulas que se iniciam no local de entrada do parasito e que evoluem para nódulos, que irão ulcerar no centro formando a lesão (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Normalmente, a lesão aparece em locais expostos como face, membros superiores e inferiores, motivo pelo qual muitas vezes a doença possui um caráter social estigmatizante (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

A resposta imune celular na LCL é do tipo Th1 (IFN- γ) com resultados de intradermoreação de Montenegro (IDRM) positivos (COSTA *et al.*, 2009a; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Mesmo após o tratamento e cura clínica, os pacientes ainda podem apresentar um processo inflamatório moderado, mas com níveis elevados das citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-4 (IL-4) e a IL-10 (VIANA, AG *et al.*, 2013).

O tratamento de primeira escolha da LCL, à base de antimoniatos, por vezes, resulta em falha terapêutica ou apresenta efeitos tóxicos como alterações da função renal, hepática, cardíaca e pancreática (NEVES, 2011; BRASIL, 2010; MACHADO *et al.*, 2002, SANTOS *et al.*, 2004). Havendo a necessidade de interrupção definitiva do tratamento à base de antimoniatos, um esquema de segunda linha, como a Anfotericina B lipossomal, pode ser indicado pelo clínico para ser utilizado pelo paciente.

1.1.3 Aspectos macroscópicos e histopatológicos da lesão cutânea na LCL

O processo de formação da lesão cutânea surge desde o repasto sanguíneo, causando perda de integridade tanto na epiderme quanto na derme com a introdução da probóscide do vetor. Essa ação física dá início a um processo inflamatório local que é potencializado pela presença do parasito e da saliva do flebótomo (ANDRADE, *et al.*, 2007; OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Macroscopicamente, este processo inflamatório inicial desencadeia uma vermelhidão e inchaço local, aumentando progressivamente de tamanho e, após um período variável de incubação que geralmente dura de 10 dias a 3 meses, desenvolve-se uma úlcera típica papular com formato arredondado ou oval e base eritematosa. A evolução dessa pápula culmina na formação de uma lesão infiltrada e de consistência firme, bem delimitada e com bordas elevadas e fundo avermelhado com granulações grosseiras e aspecto necrótico. É geralmente indolor; no entanto, se houver uma infecção bacteriana associada, pode ocorrer dor local e a produção de exsudato soropurulento (HANDLER, *et al.*, 2015; DARMSTADT, *et al.*, 2013).

Microscopicamente, a histopatologia da lesão cutânea demonstra o acometimento da epiderme e da derme, caracterizada por uma reação crônica inflamatória, algumas vezes granulomatosa, e com presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas (GONZALEZ, *et al.*, 2018). No início da formação da lesão, há um infiltrado celular dérmico denso e difuso, com a presença principalmente de neutrófilos e macrófagos. A chegada dessas células inflamatórias desencadeia um processo intenso de imunoativação que contribui para a indução de morte celular e degradação da matriz extracelular (MEC). Este quadro pode ser reflexo da ação de enzimas proteolíticas com destaque para as metaloproteases, serina proteases (como as granzimas) produzidas por células do sistema imune e pela própria *Leishmania* (LIARTE *et al.*, 2001; TURNER; LIM; GRANVILLE; 2017; HANDLER, *et al.*, 2015). Com o passar do tempo, cerca de 30% das lesões de pacientes com LCL podem apresentar granulomas de células epitelióides com células gigantes e uma borda de linfócitos, o que é um achado associado à uma boa resposta ao tratamento e resolução de ulceração. Por outro lado,

tecido conjuntivo dérmico com degeneração do colágeno ou distribuição em torno de áreas de necrose é geralmente presente (BIDDLESTONE *et al.*, 1994). Nos estágios mais tardios da lesão, encontra-se um grande número de linfócitos e células plasmáticas (MEHREGAN, *et al.*, 1997).

1.2 PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E METALOPROTEASES PARA A MORFOGÊNESE E HOMEOSTASE DA PELE

A matriz extracelular (MEC) é uma rede macromolecular tridimensional não celular composta por diferentes macromoléculas que apresentam domínios distintos com atividades estruturais e/ou biológicas definidas (SILVA-ALMEIDA; CARVALHO *et al.*, 2012). Além de fornecer não só bases físicas essenciais para os constituintes celulares, esta estrutura dá início a sinais bioquímicos e biomecânicos que são necessárias para a morfogênese e homeostase dos tecidos e sofre uma contínua remodelação mediada por várias enzimas degradantes da matriz durante condições normais e patológicas. (FRANTZ *et al.*, 2010; THEOCHARIS *et al.*, 2016). As interações célula-matriz, portanto, não apenas controlam a forma e a orientação das células, mas também podem regular direta ou indiretamente as funções celulares, incluindo a migração, diferenciação, proliferação e a expressão de genes diferentes (AUMAILLEY; GAYRAUD, 1998).

Os principais constituintes das MECs são os colágenos, elastina, fibronectina (FN), lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs). Na maioria dos tecidos, o colágeno tipo I de formação de fibras, e principalmente o colágeno de cartilagem tipo II, são os principais constituintes das MECs. Eles estão associados a outros colágenos, além de proteínas da MEC e PGs, para construir grandes estruturas fibrilares (THEOCHARIS *et al.*, 2015). Através da sua composição e estrutura, as MECs podem ser classificadas em dois tipos principais: matrizes intersticiais e pericelulares. As matrizes intersticiais ocupam espaços entre as células mesenquimais, enquanto as matrizes pericelulares estão em contato próximo com as células (THEOCHARIS *et al.*, 2012; LEBLEU *et al.*, 2007).

As metaloproteases são um grupo de enzimas necessárias para remodelagem da matriz extracelular, vascularização e migração celular em processos fisiológicos e patológicos (CHANG; WERB, 2001). São divididas em dois grupos: metaloproteases de matriz (MMPs), como MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e a MMP-12 produzidas principalmente por fibroblastos, macrófagos e neutrófilos ativados do hospedeiro (BIRDKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993) e metaloproteases de desintegrina, como a glicoproteína 63 (GP63), metaloprotease do

parasito presente na membrana da *Leishmania*. A expressão e ativação temporal de metaloproteases em resposta à lesão são vitais para a evolução de uma boa cicatrização (COLEY *et al.*, 2014).

Células como fibroblastos, células epiteliais, células imunes e células endoteliais, sintetizam e secretam macromoléculas da matriz e enzimas proteolíticas sob o controle de múltiplos sinais, participando assim da formação e remodelação de matrizes extracelulares. As variações na composição e estrutura dos componentes das MECs afetam tanto a estrutura geral quanto as propriedades biomecânicas da rede formada, e também os sinais transmitidos às células, modulando assim suas respostas. (THEOCHARIS *et al.*, 2015). Assim, a MEC pode ser entendida como uma linguagem ou código morfogênético interpretado pelas células que entram em contato com ela (ROZARIO; DESIMONE, 2010). Este caráter sinalizador/modulador indica que a matriz extracelular pode estar relacionada a uma condição de homeostase normal ou persistência de patogênese.

1.2.1 Componentes estruturais e regulatórios da matriz extracelular: estrutura, interações, funções

1.2.1.1 Proteoglicanos (Pgs)

Os PGs são biomacromoléculas que preenchem a maior parte do espaço intersticial extracelular dentro do tecido na forma de um gel hidratado. Os PGs têm uma ampla variedade de funções que refletem suas propriedades únicas de cobertura, hidratação, ligação e resistência à força (FRANTZ *et al.*, 2010). Eles interagem com vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, receptores de superfície celular e moléculas de MEC através de suas proteínas centrais ou, principalmente, através de suas cadeias laterais de GAG participando de várias propriedades funcionais celulares, como sinalização celular, proliferação, migração, diferenciação, apoptose e adesão (THEOCHARIS *et al.*, 2015).

1.2.1.2 Colágenos

Os colágenos são as proteínas mais abundantes no reino animal e constituem o principal elemento estrutural da MEC, fornecem resistência à tração, regulam a adesão celular, suportam a quimiotaxia e a migração e desenvolvimento direto do tecido (ROZARIO; DESIMONE, 2010; FRANTZ *et al.*, 2010). A maior parte do colágeno intersticial é transcrita e secretada por fibroblastos que residem no estroma ou são recrutados para ele a partir de tecidos vizinhos (DE WEVER *et al.*, 2008). O colágeno tipo I é o mais expresso e abundante nos tecidos conjuntivos que constituem a derme, o osso e o tendão. (THEOCHARIS *et al.*, 2015).

1.2.1.3 Elastinas

As elastinas são proteínas da MEC que proporcionam recuo aos tecidos que sofrem alongamento repetido. É importante ressaltar que o alongamento de elastina é crucialmente limitado pela forte associação com fibras de colágeno. As fibras de elastina são cobertas por microfibrilas de glicoproteínas, principalmente fibrilinas, que também são essenciais para a integridade da fibra de elastina (WISE; WEISS, 2009; FRANTZ *et al.*, 2010). Os domínios hidrofóbicos da elastina são responsáveis pelas propriedades elásticas da rede (MUIZNIEKS *et al.*, 2010).

1.2.1.4 Fibronectina (FN)

A FN é uma glicoproteína altamente expressa nas MECs, com funções críticas no desenvolvimento de vertebrados (THEOCHARIS *et al.*, 2015). Está envolvida no direcionamento da organização da MEC intersticial e, adicionalmente, tem um papel crucial na mediação de ligação e função celular (SMITH *et al.*, 2007). A FN também possui papel importante para a migração celular durante o desenvolvimento embrionário e tem sido implicada na doença cardiovascular e na metástase tumoral (ROZARIO; DESIMONE, 2010; TSANG *et al.*, 2010).

1.2.1.5 Lamininas

As lamininas são grandes glicoproteínas heterotriméricas em forma de cruz que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento embrionário inicial e na organogênese (THEOCHARIS *et al.*, 2015). Nos tecidos em desenvolvimento e intactos, as lamininas são incorporadas às membranas basais, que separam as células parenquimatosas do tecido conjuntivo (HAMILL *et al.*, 2009). As lamininas desempenham papéis importantes na morfogênese e homeostase dos tecidos, regulando a arquitetura dos tecidos, a adesão celular, a migração e a sinalização mediada por matriz (MCGOWAN *et al.*, 2000).

1.2.1.6 MMP-2 (gelatinase A):

A MMP-2 utiliza como substrato os colágenos I, IV, V, VII e X, laminina, agregan, fibronectina e tenascina. Esta gelatinase é responsável por acelerar a migração de células para o tecido (CALEY, *et al.*, 2015). Sua presença na borda de lesões agudas está ligada à expressão de laminina-332 e ao aumento da migração dos queratinócitos (MOSES *et al.*, 1996).

1.2.1.7 MMP-3 (estromelisina - 1)

A MMP-3 utiliza como substrato os colágenos IV, V, IX e X, fibronectina, elastina, gelatina, agrecan, nidogênio, fibrilina, E-caderina. Esta estromelisina é expressa por queratinócitos na região proximal e afeta a contração da lesão, (CALEY *et al.*, 2015).

1.2.1.8 MMP-8 (colagenase-2)

A MMP-8 utiliza como substrato os colágenos I, II e III, agrecan, serpinas e 2-MG. Esta colagenase é predominante durante a cicatrização de feridas (CALEY *et al.*, 2015). Uma expressão aumentada de MMP-8 em feridas crônicas é prejudicial ao reparo de feridas, causando a quebra do colágeno tipo I (DANIELSEN *et al.*, 2011).

1.2.1.9 MMP-9 (gelatinase B)

A MMP-9 utiliza como substrato os colágenos I, III, IV, V e VII, agrecan, elastina, fibrilina. Esta gelatinase é expressa por queratinócitos na borda principal da ferida e contribui para a migração de célula e reepitelização (CALEY *et al.*, 2015). Sua secreção descontrolada tem sido associada a processos patológicos.

1.2.1.10 MMP-12 (metaloelastase)

A MMP-12 utiliza como substrato o colágeno IV, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, elastina, fibrilina, Inibidor de 1-proteinase e apolipoproteína A. Esta metaloelastase é expressa apenas por macrófagos (CALEY *et al.*, 2015).

1.2.2 Papel das metaloproteases de matriz extracelular na leishmaniose cutânea localizada

O processo inflamatório desencadeado após a infecção com *Leishmania spp.* induzindo a produção e liberação de metaloproteases do hospedeiro representa um papel importante na progressão da lesão (MURASE *et al.*, 2018). A infecção por *Leishmania spp.* estimula a produção de metaloproteases do hospedeiro através de macrófagos infectados, levando à disrupção da matriz extracelular, e, promovendo assim, a disseminação do parasito para outros sítios (LIARTE *et al.*, 2001; CARVALHAL *et al.*, 2004). Na infecção por *L. braziliensis*, já foi demonstrada uma ligação direta entre a presença de metaloprotease de matriz 1 (MMP1), dano tecidual e progressão da doença (NOVAIS *et al.*, 2015; ALMEIDA, *et al.*, 2017) e também o aumento da ativação de metaloprotease de matriz 9 (MMP9) em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* (MARETTI-MIRA *et al.*, 2011a).

A gelatinase MMP9 possui uma função essencial na degradação dos componentes da matriz durante a transmigração das células de defesa do hospedeiro e migração de macrófagos (WOESSNER, 1994; GONG *et al.*, 2008; TOMLINSON *et al.*, 2008; REICHEL *et al.*, 2008). Além disso, altos níveis desta gelatinase indicam um risco aumentado de disseminação do parasito e desenvolvimento de leishmaniose mucosa (MURASE *et al.*, 2018). Por outro lado, macrófagos de indivíduos com atividade reduzida de MMP9 podem ter uma infecção por *L. braziliensis* controlada no local de entrada, fazendo com que estes indivíduos desenvolvam apenas a forma cutânea localizada da doença (MARETTI-MIRA *et al.*, 2011a). Outros estudos também apontaram que pacientes na fase pré-ulcerativa da doença produzem níveis de MMP-9 menores do que os que estão em fase ulcerativa, sugerindo que a progressão da doença para a fase ulcerativa pode estar associada com o aumento dos níveis de MMP-9 (CAMPOS *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem que o monitoramento precoce dos níveis de MMP-9 pode ser uma ferramenta promissora para que seja possível estabelecer a probabilidade de progressão clínica e/ou cura terapêutica (MURASE *et al.*, 2018).

Outra metaloprotease que aparenta possuir papel durante a LCL é a MMP-2. Níveis baixos de MMP-2 e níveis altos de MMP-9 foram reportados em lesões de pacientes com baixa resposta ao tratamento antimonial (MARETTI-MIRA *et al.*, 2011b). O aumento de MMP-2 está também associado com o processo de re-epitelização das lesões e sucesso terapêutico (MARETTI-MIRA *et al.*, 2011b). Ainda assim, outros estudos são necessários para afirmar o potencial da MMP-2 no desenvolvimento da LCL (MURASE *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a LCL é uma das patologias dermatológicas que necessita de atenção, pois, além de ser uma doença com alta morbidade também possui um caráter social estigmatizante devido a ocorrência de lesões desfigurantes, principalmente em locais expostos como a face. Pode ser considerada, também, uma doença ocupacional por existir um envolvimento psicológico que reflete tanto no campo social quanto econômico.

Durante a formação da lesão o processo inflamatório estimula a produção de metaloproteases e outras enzimas que estão relacionadas a degradação da matriz extracelular. Essa degradação possui papel fundamental numa reepitelização/cicatrização mais rápida do tecido. Entretanto, o perfil de metaloproteases pode estar associado a danos no tecido durante a infecção como também à uma resposta satisfatória ao tratamento, dependendo de quais as metaloproteases envolvidas. Essa dualidade reforça a necessidade de um estudo aprofundado e elucidativo do perfil de metaloproteases assim como sua função.

Através da avaliação de metaloproteases e citocinas pró e anti-inflamatórias, será possível compreender, de maneira mais completa, os mecanismos de degradação da matriz extracelular associados a progressão da leishmaniose. Desta maneira, será viável ampliar os conhecimentos em relação aos mecanismos de patogênese e fornecer opções alternativas de vias e moléculas alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos.

3 HIPÓTESE

Metaloproteases contribuem para o aumento da degradação da matriz extracelular e consequente cronificação do processo inflamatório na formação da lesão da LCL no modelo murino.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do processo inflamatório e proteases na degradação e formação da matriz extracelular, a fim de entender o impacto destes na formação da lesão na LCL.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar e quantificar a degradação de matriz extracelular nas lesões e linfonodos de drenagem de camundongos Balb/c infectados por *L. braziliensis*;
- b. Caracterizar e quantificar metaloproteases e células produtoras dessas enzimas nas lesões e linfonodos de drenagem de camundongos Balb/c infectados por *L. braziliensis*;
- c. Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nas lesões e linfonodos de drenagem de camundongos Balb/c infectados por *L. braziliensis*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008 e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IGM, conforme parecer de número 004/2018.

5.2 ANIMAIS

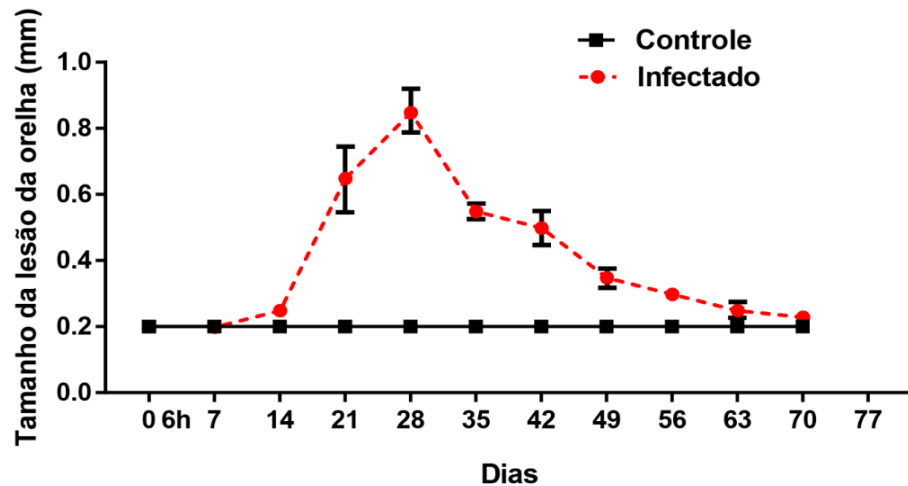
Camundongos isogênicos da linhagem Balb/c, fêmeas, com faixa etária de 4 a 6 semanas de idade, foram obtidos e mantidos no Biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ-BA).

5.3 CULTURA DE PARASITOS

Para a cultura de parasitos, a cepa de *L. braziliensis* (MCAN/BR/00/BA788) foi mantida em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco) e incubada à 26°C. Foi feita apenas uma passagem e o crescimento da cultura foi acompanhado até a fase estacionária, onde foi realizada a centrifugação com solução salina (3.000rpm, 4°C por 5 minutos) e contagem para a obtenção de 10⁵ parasitos a cada 10 microlitros.

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 192 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c com 4-6 semanas de vida. Os animais foram infectados com inoculação subcutânea na orelha com 10⁵ parasitos de *L. braziliensis*. No total, para o ensaio da microscopia ótica foram utilizados 36 camundongos, para a microscopia eletrônica também foram utilizados 36 camundongos, para o imunoenensaio por técnica de luminex foram utilizados 60 camundongos e para o ensaio de degradação de matriz foram utilizados 60 camundongos. Em cada ponto de infecção, foram coletados o linfonodo e a orelha dos animais e realizado o acompanhamento da espessura da orelha (Figura 2). Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, numa porcentagem crescente de 30%/min.



Microscopia ótica	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Microscopia eletrônica	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Imunoensaio	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Degradação da matriz	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Figura 2. Representação gráfica da espessura da lesão da orelha de camundongos Balb/C infectados por *L. braziliensis* ao decorrer do tempo (0 horas até 70 dias). Em cada tempo foram sacrificados 3 camundongos para microscopia ótica, 3 para microscopia eletrônica, 5 para imunoensaio e 5 para avaliação da degradação de matriz.

5.5 HISTOPATOLOGIA

Semanalmente, foram eutanasiados 3 camundongos e coletados linfonodo e orelha. Foi realizada a macrotomia transversal do tecido e as secções foram colocadas em cassetes e identificadas à lápis e fixadas em paraformaldeído 4% (diluído em PBS 1%) por até no máximo 24 horas. Após a fixação o material foi lavado, desidratado, diafanizado e incluído na parafina. Para destacar elementos da matriz extracelular utilizamos a coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para corar regiões basófilas (hematoxilina) e acidófilas (eosina); para análise qualitativa de fibras colágena I e III utilizamos o Método pico-sirius. As lâminas foram analisadas através do microscópio Olympus BX-52 e as imagens adquiridas através do software ImagePro Plus 7.

5.6 EXTRAÇÃO PROTEICA

Semanalmente foram eutanasiados 5 camundongos e coletados linfonodo e orelha para análise quantitativa através da tecnologia Luminex™ xMAP. Assim que coletado, o material foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido. Para a extração, as amostras congeladas foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido, evitando o descongelamento

das mesmas. O macerado foi colocado numa solução do tampão de extração proteica (T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent) juntamente com o inibidor de fosfatase e protease (Halt™ Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail 100x). Em seguida, foi feita então a centrifugação à 10.000xg durante 5 minutos e coletado o sobrenadante para o imunoensaio subsequente.

5.7 IMUNOENSAIO

Para a detecção das citocinas (IL-6, IL-10, IL-13, IL-4) e das metaloproteases (MMP12, MMP2, MMP3, MMP8, pro-MMP9) no sobrenadante de orelha e linfonodo foi utilizada a Tecnologia Luminex™ xMAP, utilizando os Kits Milliplex (MILLIPLEX MAP Mouse CD8+ T Cell Magnetic Bead Panel e MILLIPLEX MAP Mouse MMP Magnetic Bead Panel 3 ambos da MERCK). A diluição dos sobrenadantes de orelha e linfonodo para a dosagem das metaloproteases foi de 1:4 e para a dosagem de citocinas não houve diluição das amostras. Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios e foram realizados em placas de 96 poços, onde já foi colocado o mix de microesferas acoplado a anticorpos de captura específicos para as citocinas e metaloproteases específicas. Os padrões e as amostras foram adicionados para que ocorresse a ligação do anticorpo de captura ao analito específico. A próxima etapa foi a adição do anticorpo de detecção biotilado que se ligou ao analito específico. O resultado final foi amplificado através de incubação com estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). SA-PE se ligou ao anticorpo biotilado e é responsável pela revelação do ensaio, por meio da emissão de sinal fluorescente. As microesferas foram lidas no equipamento Luminex através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. No Luminex, um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal em cada microesfera. Ao passarem pelo fluxo celular Luminex, cada microesfera foi identificada e o sinal SA-PE associado a elas foi quantificado. Os valores dos padrões permitiram a construção de uma curva padrão, a partir da qual foi feita a quantificação das amostras. O resultado final foi obtido em pg/mL.

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para este ensaio, foram utilizados 36 animais no total, sendo eutanasiados semanalmente 3 camundongos e coletados a orelha e o linfonodo. As amostras de orelha e linfonodo de cada tempo foram fixadas com Glutaraldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio

0,1M, pH7,4, por 1-2hr em temperatura ambiente, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH7,4. Passaram pela pós-fixação com Tetróxido de ósmio 1% + Ferricianeto de potássio 0,8% + cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 1h em temperatura ambiente, desidratadas em séries de acetona e incorporadas em resina polipolar overnight (no mínimo 6 horas). O emblocamento foi feito num molde específico, preenchido com resina e o fragmento de interesse. O material foi polimerizado em estufa a 60°C por três dias. As secções finas foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e observadas sob um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 109).

5.9 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DAS MATRIZES TRIDIMENSIONAIS FLUORESCENTES

Foram utilizados 60 camundongos no total, sendo sacrificados 5 camundongos semanalmente e coletados a orelha e linfonodo. Para realização dos experimentos de degradação de matriz fibrilar, foi utilizado matriz de colágeno tipo I, preparada na concentração de 2 mg/mL (Collagen I, Gibco) com 10% PBS tampão fosfato salino 10X, 0,26 % NaOH e 10% de gelatina florescente (Invitrogen), em placa de 96 poços. Após 1h de polimerização, foi colocado 5×10^5 de macerado de linfonodo, macerado de orelha ou de medula óssea de camundongos BALB/c. Em seguida, essas células foram incubadas ou não com *L. braziliensis*, na presença ou não do inibidor de metaloproteinases da matriz extracelular GM6001 MMP Inhibitor (Sigma-Aldrich) 1:1000. As células foram incubadas por 48h a 37°C e 5% de CO₂, para migração e fixadas com paraformaldeído 4%. As análises foram feitas em microscópio invertido de fluorescência, e a degradação da matriz foi quantificada utilizando o software Fiji.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos as análises estatísticas descritivas e não-paramétricas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão Mac 7.0). Após avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Bonferroni para distribuições não gaussianas e comparações entre três ou mais grupos. As diferenças entre os grupos testados foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 DESENVOLVIMENTO DE LESÃO ULCERADA AUTORESOLUTIVA EM CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM *L. braziliensis* NA DERME DA ORELHA

Para caracterizar e descrever o processo inflamatório celular e de organização de matriz extracelular nos camundongos infectados, foi realizado o acompanhamento macroscópico, histopatológico e proteico da orelha e do linfonodo de drenagem semanalmente até a cicatrização total da lesão, incluindo os pontos iniciais de 0h e 6h e o ponto tardio de 70 dias após infecção (Figura 3). Para isso, foram realizados 4 ensaios de infecção independentes: para o ensaio da microscopia ótica (MO) foram utilizados 36 camundongos, para a microscopia eletrônica (ME) foram utilizados 36 camundongos, para o imunoensaio por técnica de luminex foram utilizados 60 camundongos e para o ensaio de degradação de matriz foram utilizados 60 camundongos. Em cada ponto de infecção foram coletados o linfonodo e a orelha dos animais (n=3 para MO e ME; n=5 para luminex e degradação da matriz) e realizado o acompanhamento da espessura da orelha. Três dos 4 ensaios apresentaram o pico da lesão no dia 35, apenas o ensaio de infecção para a realização do imunoensaio por técnica de luminex apresentou o pico da lesão no dia 28 (Figura 8a e figura 9a). Segue abaixo a descrição detalhada do ensaio representativo de infecção para a realização da microscopia ótica.

Os camundongos infectados desenvolveram uma induração, com a formação de lesão dérmica que resulta no aumento da espessura da orelha detectável no dia 21 (dia 21, mediana=0,55 mm; IIQ=0,50-0,65). A induração e a lesão dérmica progrediram de forma constante e atingiu um pico máximo de espessura da orelha no dia 35 (dia 35, mediana=1,02 mm; IIQ=1-1,04). Depois disso, a induração e a lesão dérmica regrediram e a cicatrização completa da orelha foi observada entre os dias 56 e 63 após a infecção. A lesão dérmica observada no dia 35 foi nodular e ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico, semelhante à lesão dérmica observada em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

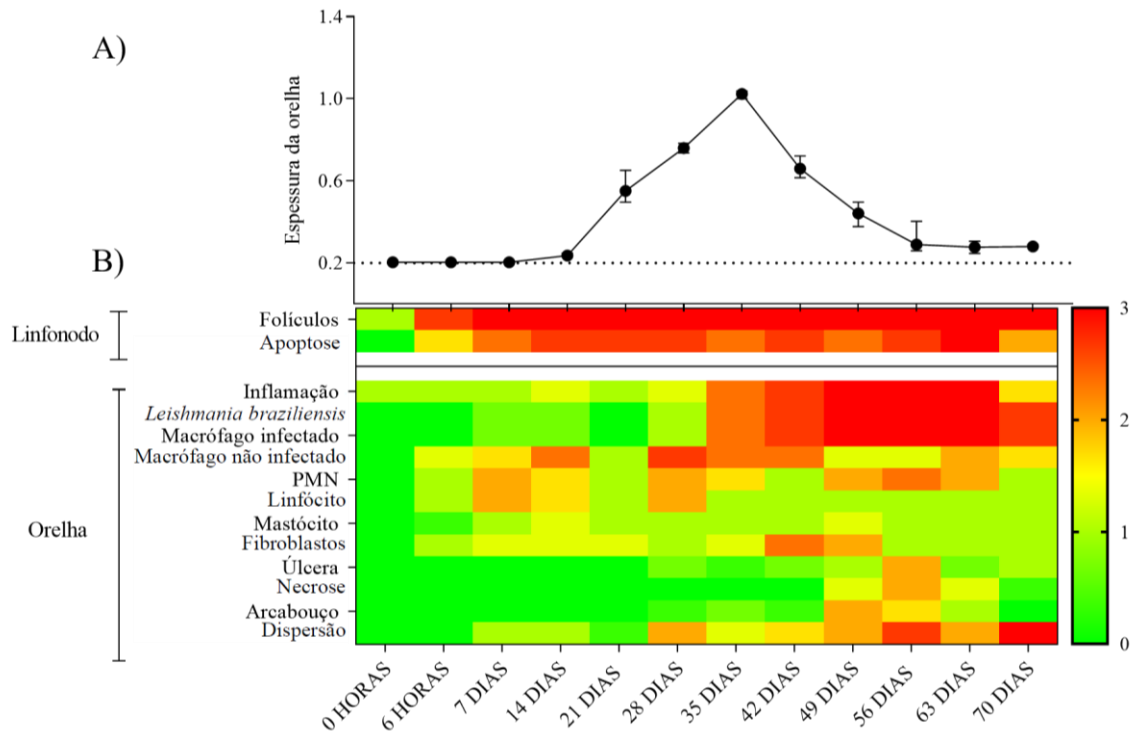


Figura 3. Acompanhamento histopatológico do modelo de LCL murino ao longo do tempo. Nesse ensaio foram utilizados 3 camundongos Balb/c por ponto de infecção (0 horas até 70 dias) e coletado tecido de orelha e linfonodo. O material foi processado e corado com HE, para identificar regiões basófilas e acidófilas e Picro-sirius, para marcação do colágeno. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica. A) Gráfico de espessura da lesão (em cm) na orelha de camundongos Balb/c ao decorrer dos tempos de infecção. B) Mapa de calor representando os seguintes parâmetros: para linfonodo, presença de folículos e apoptose e para orelha, presença de infiltrado inflamatório, *L. braziliensis*, macrófago infectado, macrófago não infectado, polimorfonucleares (PMN), linfócito, mastócito, fibroblastos, necrose, formação de arcabouço (na matriz extracelular) e dispersão da matriz extracelular. O gradiente de cor padrão representa a média da triplicata da escala semi-quantitativa (0=ausência, 1=pouco, 2=médio e 3=muito) determinada pelo patologista, onde o verde representa a ausência de detecção do parâmetro (escala=0) e o vermelho representa a maior quantidade observada do parâmetro (escala=3).

6.2 ACOMPANHAMENTO HISTOPATOLÓGICO DA LESÃO DA ORELHA NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO

Para entender a dinâmica celular e estrutural do tecido da orelha durante o processo inflamatório responsável pelo desenvolvimento da induração e formação da lesão dérmica, foi realizada uma avaliação histopatológica detalhada que resultou na identificação e quantificação (Escala de 0 a 3) temporal de populações celulares, e dispersão (Escala de 0=0% a 3=100%) (percentual de matriz colagênica em relação a área da orelha) e formação de arcabouço da matriz extracelular (Figura 3).

Foi observado desde o primeiro momento após a infecção uma presença de um infiltrado inflamatório (0h, média=1, EPM=0), que se manteve quantitativamente estável até o dia 28 (dia 28, média=1,33, EPM=0,33). Entre os dias 35 e 63, o infiltrado inflamatório atingiu os níveis mais altos (dia 35, média=2,33, EPM=0,33 e dia 63, média=3, EPM=0), regredindo apenas no dia 70 após a infecção (dia 70, média=1,67, EPM=0,33).

Durante a primeira etapa de estabelecimento do infiltrado inflamatório que durou até o dia 28 (Figura 4), foi observado a partir de 6h um aumento discreto de mastócitos (6h, média=0,33, EPM=0,33 e dia 28, média=1, EPM=0) e fibroblastos (6h, média=1, EPM=0 e dia 28, média=1, EPM=0) e um aumento robusto de polimorfonucleares (6h, média=1, EPM=0 e dia 28, média=2, EPM=0), linfócitos (6h, média=1, EPM=0 e dia 28, média=2, EPM=0) e macrófagos não infectados (6h, média=1,33, EPM=0,33 e dia 28, média=2,67, EPM=0). No dia 14 (Figura 4d), foi possível observar uma mudança de perfil inflamatório com aparência mais crônica, aumento da proporção de células mononucleares, presença de macrófagos com citoplasma amplo e diversos mastócitos parcialmente degranulados. Aos 28 dias de infecção, foi possível detectar a presença de parasitos em todas as réplicas analisadas, estando mais concentrados no centro da lesão (Figura 4f).

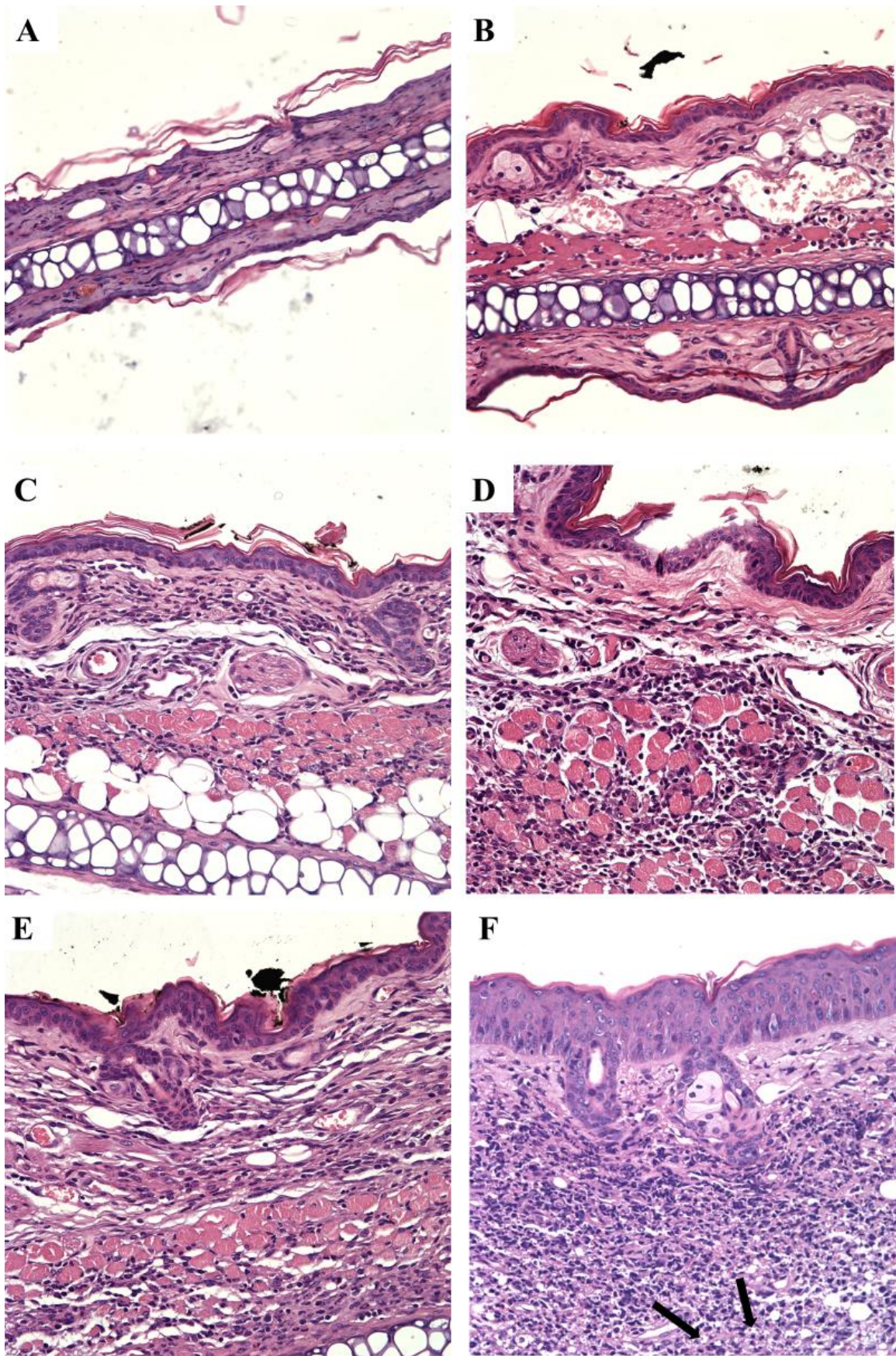


Figura 4. Análise histopatológica da orelha no modelo murino de LCL do tempo 0h até 28 dias. Foram utilizados 3 camundongos BALB/c por ponto de infecção (0 horas até 70 dias) e

coletado o tecido de orelha de cada um. O tecido foi processado e corado com HE. As lâminas então foram analisadas através de microscópio ótico de campo claro. Fotos representativas de cortes transversais de orelha de camundongo (aumento de 40x) de cada tempo de infecção (A – F). (A) 0 horas. (B) 6 horas. (C) 7 dias. (D) 14 dias. (E) 21 dias. (F) 28 dias. As setas pretas indicam as amastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Durante a segunda etapa do infiltrado inflamatório que durou entre o dia 35 e o dia 63 (Figura 5), foi observado uma queda no número de linfócitos (dia 35, média=1, EPM=0 e dia 63, média=1, EPM=0), com uma estabilidade no número de macrófagos não infectados (dia 35, média=2,63, EPM=0,67 e dia 63, média=2, EPM=0), polimorfonucleares (dia 35, média=1,67, EPM=0,33 e dia 63, média=2, EPM=0) e mastócitos (dia 35, média=1, EPM=0 e dia 63, média=1, EPM=0), acompanhado de um aumento robusto e duradouro de macrófagos infectados (dia 35, média=2,33, EPM=0,33 e dia 63, média=3, EPM=0) com muitas amastigotas de *L. braziliensis* (dia 35, média=2,33, EPM=0,67 e dia 63, média=3, EPM=0). O número de fibroblastos aumentou de maneira robusta nos dias 42 e 49 (dia 42, média=2,33, EPM=0,33 e dia 49, média=2, EPM=0,57) e depois mantiveram os mesmos níveis do início da infecção (dia 63, média=1, EPM=0). Qualitativamente, foi observado um infiltrado inflamatório mais rico, com a presença de macrófagos epitelióides e uma diversidade maior de células na periferia da lesão. Aos 42 dias, observou-se um aumento da quantidade de células epitelióides e a presença de diversos mastócitos parcialmente degranulados (Figura 5b). Com 49 dias, surpreendentemente, houve um aumento na quantidade de parasitos visíveis (Figura 5c). Na periferia da lesão encontramos uma menor distribuição de parasitos e uma necrose bem profunda, sinalizando o início do reparo. Aos 56 dias de infecção, observamos uma forte presença de necrose, formação de abscesso e a presença contínua de parasitos (Figura 5d).

No último dia do acompanhamento da infecção, houve uma redução moderada do infiltrado inflamatório (dia 70, média=1,67, EPM=0,33), representado pela queda na presença de polimorfonucleares (dia 70, média=1, EPM=0) (Figura 5f). As outras populações celulares e amastigotas de *L. braziliensis* mantiveram níveis constantes até a cicatrização completa da lesão.

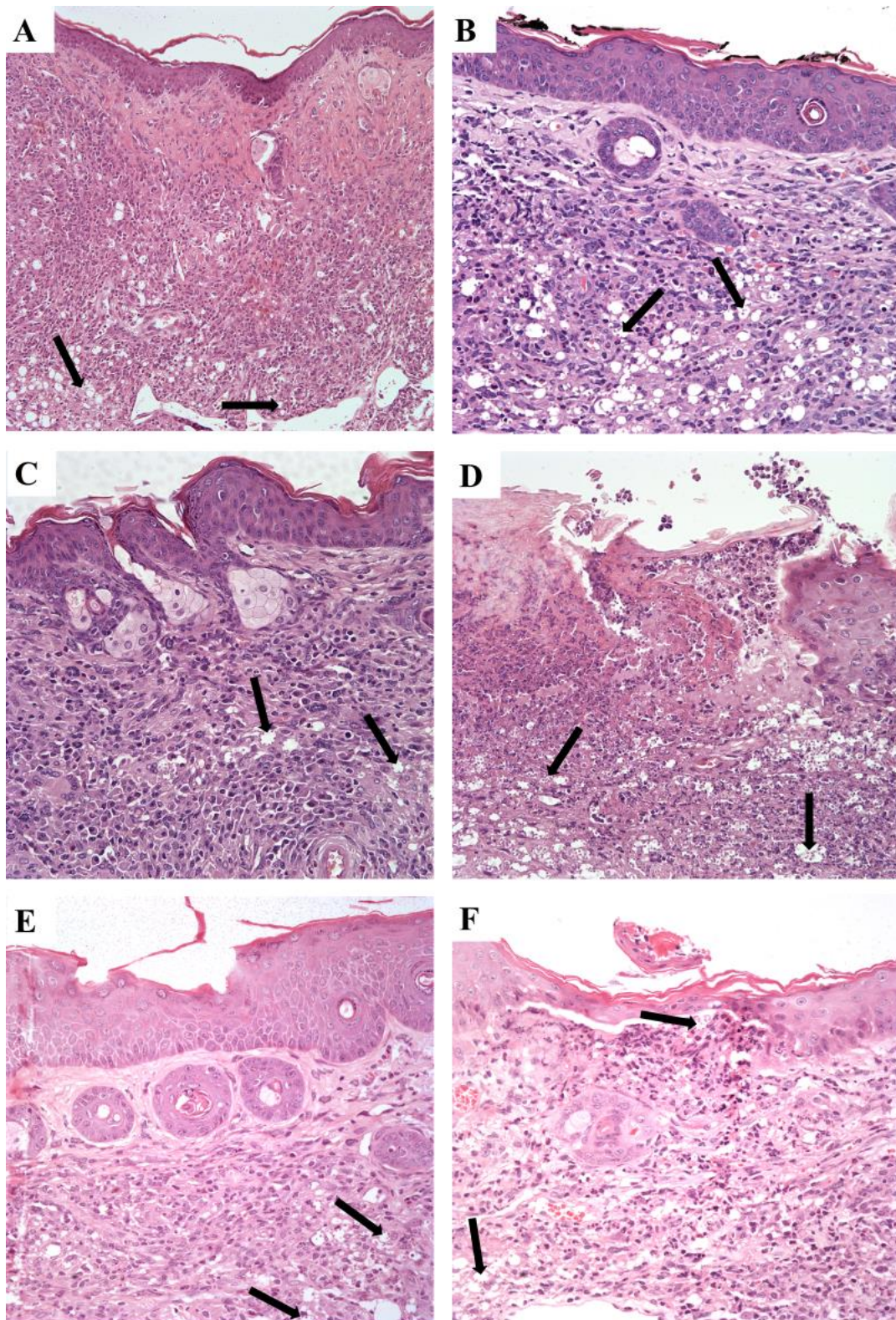


Figura 5. Análise histopatológica da orelha no modelo murino de LCL ao longo do tempo do tempo 35 dias até 70 dias. Foram utilizados 3 camundongos BALB/c por ponto de infecção (0 horas até 70 dias) e coletado o tecido de orelha de cada um. O tecido foi processado e corado com HE. As lâminas então foram analisadas através de microscópio ótico de campo claro. Fotos representativas de cortes transversais de orelha de camundongo (aumento de 40x) de cada tempo de infecção (A – F). (A) 35 dias. (B) 42 dias. (C) 49 dias. (D) 56 dias. (E) 63 dias. (F) 70 dias. As setas pretas indicam as amastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Na análise da organização da matriz, a partir do dia 7 após a infecção, foi observado um aumento gradual e robusto na dispersão da matriz extracelular até o último dia de acompanhamento (dia 7, média=1, EPM=0, dia 70, média=3, EPM=0) (Figura 3). Ademais, nos dias 49 e 56 houve a formação de um arcabouço, onde a matriz apresentou um comportamento semelhante a uma rede, envolvendo as células ao longo do tecido (Figura 6). Avaliamos através de microscopia eletrônica de transmissão o ponto 49 dias após a infecção, onde identificamos o início da formação deste arcabouço. Na lâmina do tempo 0h (Figura 7a e 7b), a disposição da matriz extracelular é uniforme e mais concentrada em locais específicos. Nas lâminas de 49 dias (Figura 7c à 7f), encontramos uma maior dispersão das fibras de colágeno, muitas vezes se localizando próximo a parasitos e principalmente entre células.

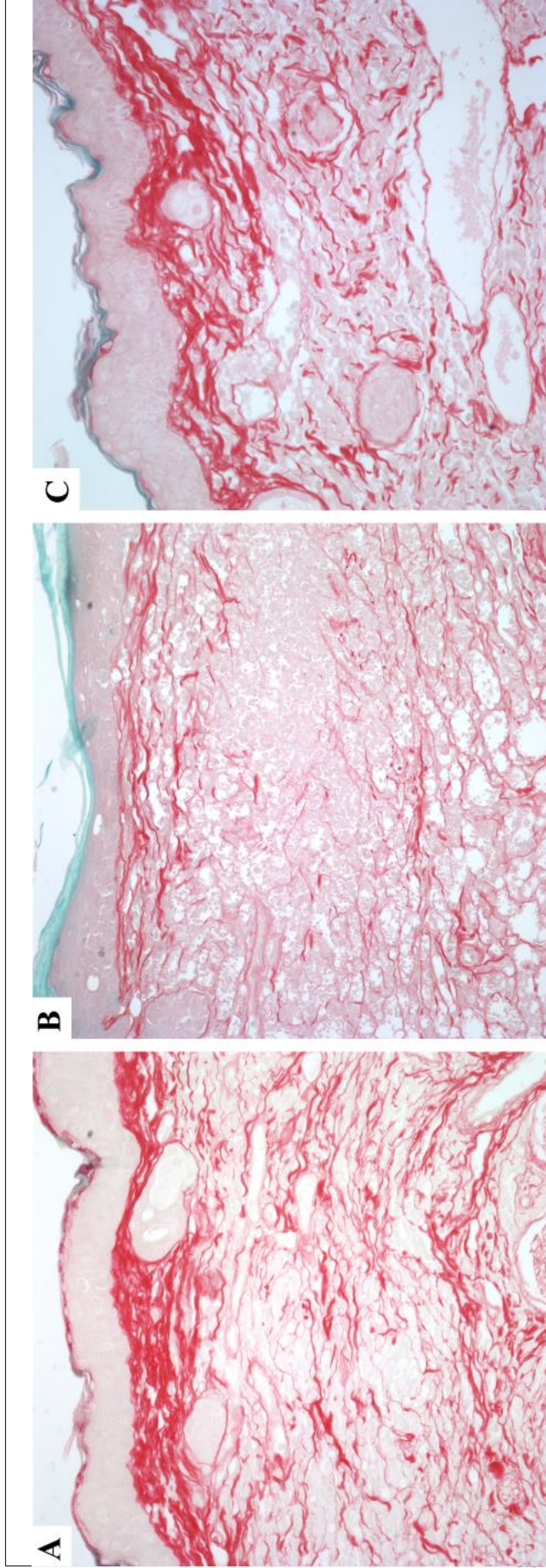


Figura 6. Análise histopatológica no modelo murino de LCL ao longo do tempo. Foram utilizados 3 camundongos BALB/c por ponto de infecção (0 horas até 70 dias) e coletado o tecido de orelha de cada um. O tecido foi processado e corado com Picro-sirius para destacar as fibras de colágeno. As lâminas foram analisadas através de microscópio ótico de campo claro. Fotos representativas de cortes transversais de orelha de camundongo (aumento de 40x) dos tempos de infecção (A – C). (A) 49 dias. (B) 56 dias (C) 63 dias.

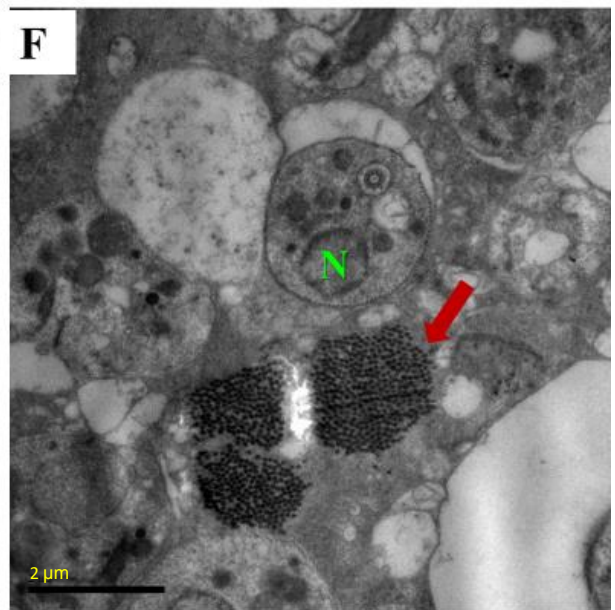
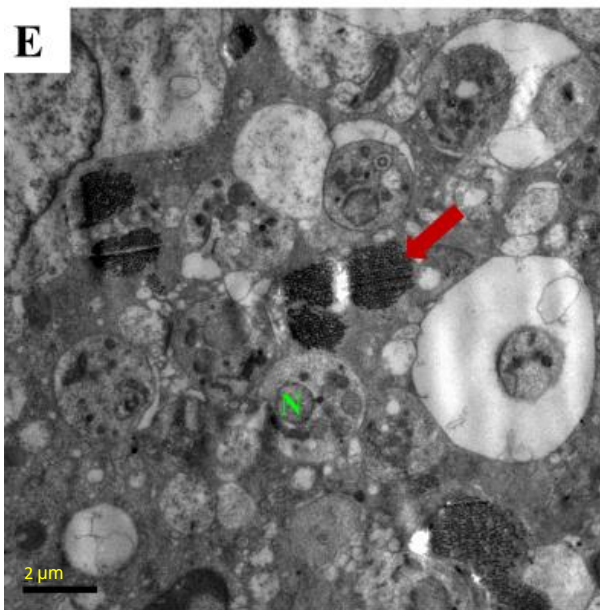
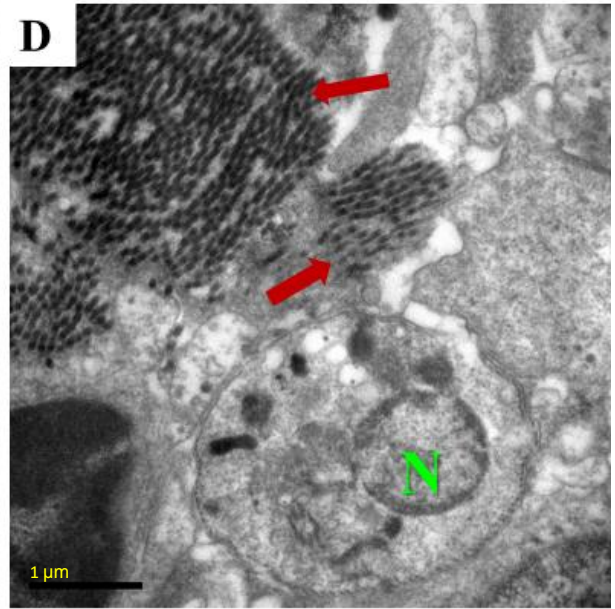
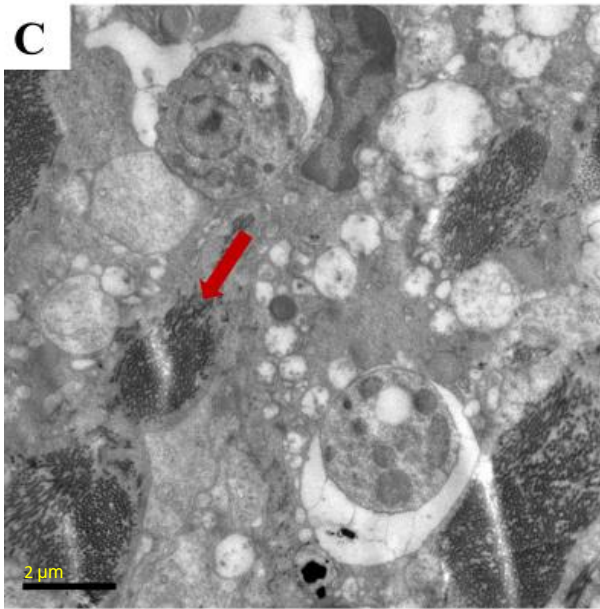
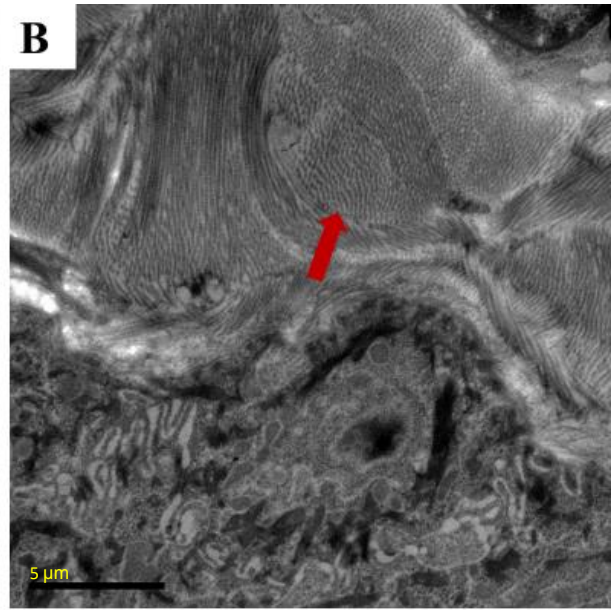
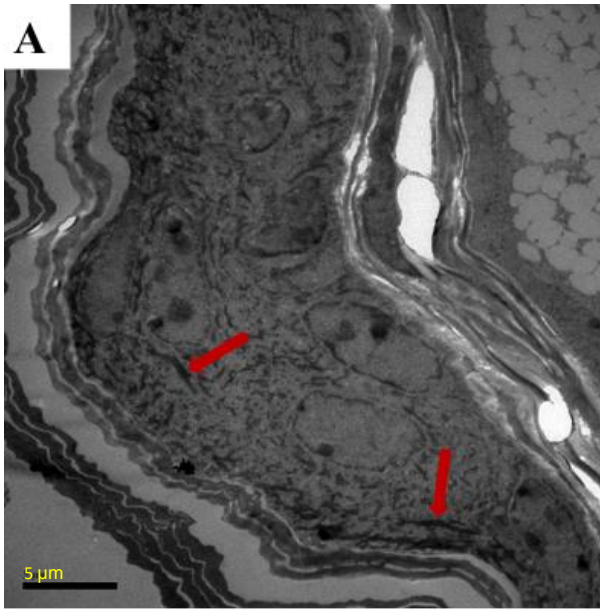


Figura 7. Dispersão da matriz extracelular e formação de arcaço a partir dos 49 dias de infecção. Microscopia eletrônica de transmissão do tecido de orelhas de camundongos Balb/c infectados por *L. braziliensis*. (A e B) Fotografia representativa da orelha controle (0 horas de infecção). (C – F) Fotografias representativas da orelha com 49 dias de infecção. As setas vermelhas indicam as fibras de colágeno. Abreviações: N – Núcleo da *Leishmania braziliensis*.

6.3 ACOMPANHAMENTO HISTOPATOLÓGICO DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO

Para entender microscopicamente a dinâmica celular e estrutural do tecido do linfonodo de drenagem durante o processo inflamatório responsável pelo desenvolvimento da induração e formação da lesão dérmica, foi realizada uma avaliação histopatológica detalhada que resultou na identificação e quantificação temporal de folículos e apoptose (Escala de 0 a 3).

No linfonodo, observamos um perfil mais homogêneo (Figura 3b), onde a partir das 6 horas de infecção já existe formação significativa de folículos (6h, média=2,67, EPM=0,33, dia 70, média=3, EPM=0) e presença de apoptose (6h, média=1,67, EPM=0,33, dia 70, média=2, EPM=0) que se estendem até o último ponto de infecção (70 dias).

6.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO

Para determinar o perfil de resposta imunológica inata e adaptativa, foi realizado a quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-13, IL-4) no extrato proteico da orelha infectada e do linfonodo de drenagem dos camundongos BALB/C infectados com *L. braziliensis*. Entre as citocinas testadas, os níveis de IL-4 e IL-6 na orelha e no linfonodo de drenagem acompanharam o aumento e a regressão da espessura da orelha, atingindo o pico de produção exatamente no mesmo dia que a orelha atinge sua maior espessura (Figura 8). Os níveis de IL-10 também seguem o mesmo padrão, mas a produção da citocina é muito menor do que as outras duas. Os níveis de IL-4 e IL-6, no dia 35, são 2,56 e 16,45 vezes maiores na orelha do que no linfonodo, respectivamente. Os níveis da citocina IL-13 ficaram abaixo do limite de detecção em todos os pontos e em ambos os tecidos (Figura 8).

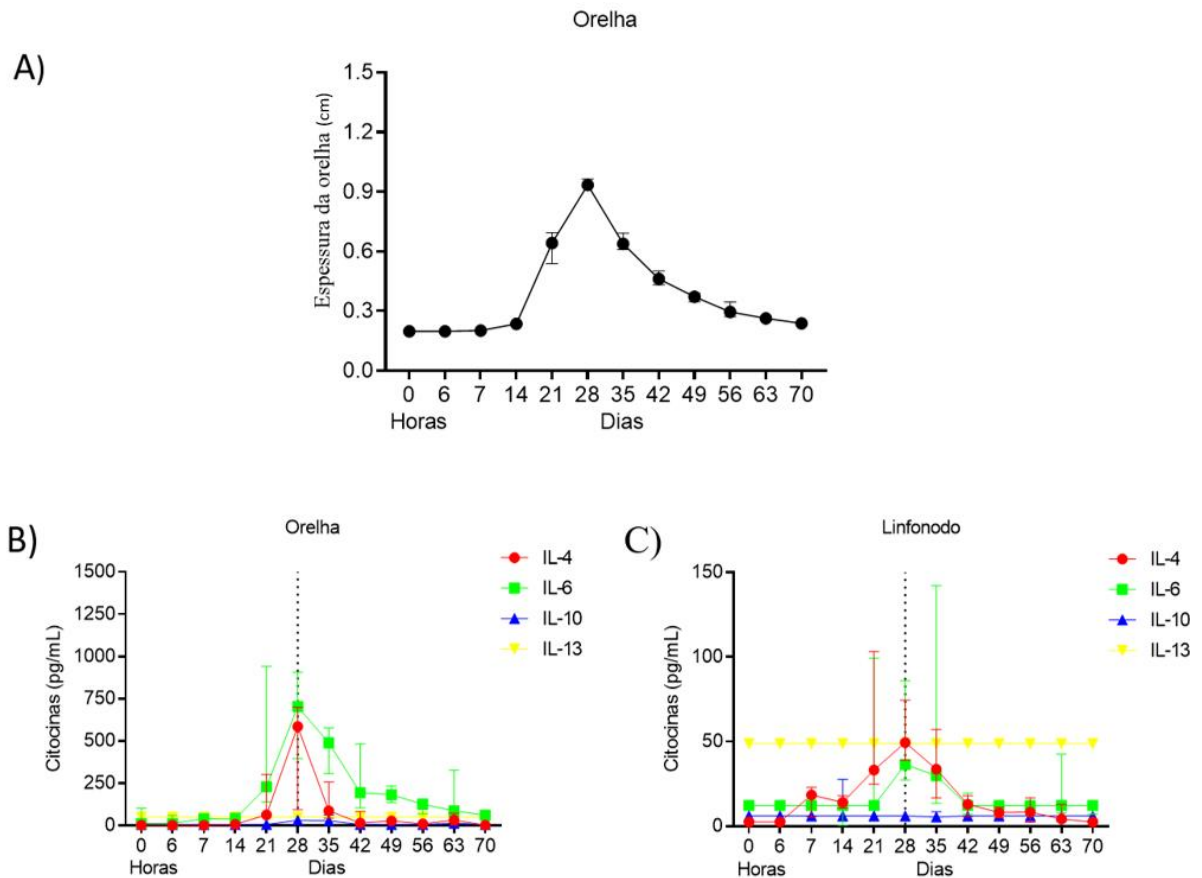
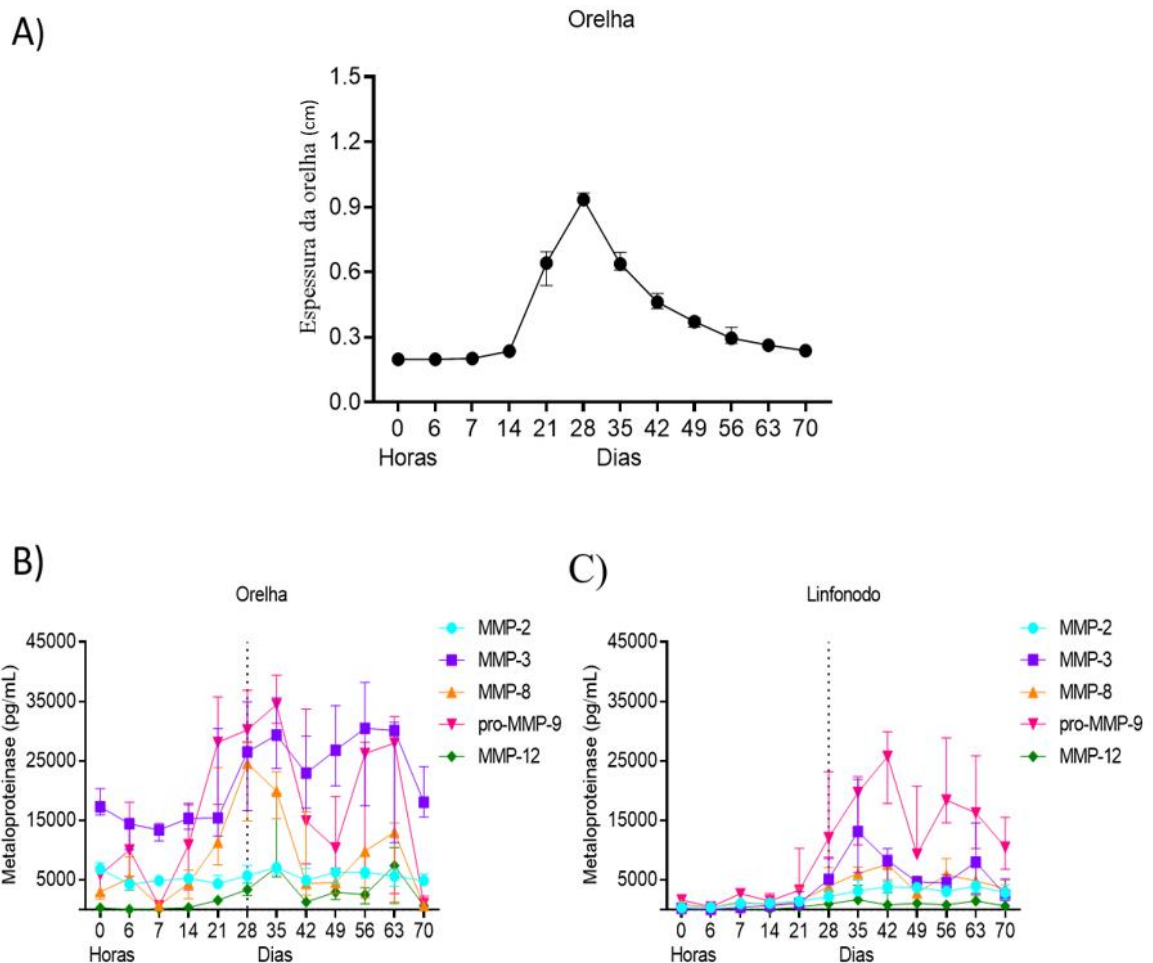


Figura 8. Perfil de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo de LCL murino ao longo do tempo. Para este ensaio foram utilizados 5 camundongos por tempo de infecção (0h até 70 dias) e coletamos a orelha e linfonodo para a dosagem das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 através da Tecnologia Luminex™ xMAP. (A) Gráfico de acompanhamento da espessura da lesão na orelha de camundongos Balb/C ao decorrer dos tempos de infecção (0 horas até 70 dias). Em (B) e (C) os resultados são mostrados como gráfico de linhas com símbolos sobrepostos em mediana com intervalo interquartil. Em (B) temos a dosagem dos níveis de citocinas em pg/mL ao longo do tempo na orelha de camundongos Balb/c. E em (C) a dosagem dos níveis de citocinas em pg/mL ao longo do tempo no linfonodo de camundongos Balb/c.

6.5 PERFIL DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEASES DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO DE LCL MURINO AO LONGO DO TEMPO

Para compreender a sequência de eventos associada a distribuição da matriz extracelular e a formação do arcabouço no tecido, foi realizado a quantificação longitudinal de metaloproteases (MMP12, MMP2, MMP3, MMP8 e pro-MMP9) no extrato proteico de orelha infectada e no linfonodo de drenagem de camundongos Balb/c infectados com *L. braziliensis*. Desde o primeiro momento após infecção (0h), todas as enzimas quantificadas apresentaram valores significativamente maiores na orelha infectada (Figura 9b) do que no linfonodo de

drenagem (Figura 9c), principalmente a MMP-3 (Cálculo da razão para MMP-2=18,64, MMP-3=73,37, MMP-8=3,35, pro-MMP-9=3,58 e MMP-12=41). É importante destacar que as enzimas detectadas na orelha aumentaram a expressão a partir do dia 14, uma semana antes do aumento detectável da espessura da orelha, atingindo o pico de produção no dia 35, uma semana após ao pico máximo da espessura da orelha. No linfonodo de drenagem, as enzimas aumentaram sua expressão no dia 28, chegando ao pico de produção no dia 42, caracterizando uma expressão tardia quando comparada aos eventos de formação da lesão do modelo. Surpreendentemente, os níveis de expressão das enzimas em ambos os tecidos caem simultaneamente no dia 49, principalmente as enzimas MMP8 e pro-MMP9, período que foi identificado a formação do arcabouço da matriz extracelular. Contudo, os níveis das enzimas voltaram a crescer nos dias subsequentes (dias 56 e 63), porém sem ressurgimento de lesão. No último dia avaliado após infecção (dia 70), os níveis de expressão das enzimas voltam a cair drasticamente, retornando a valores similares ao início da infecção em ambos os tecidos (Figura 9).



coletamos a orelha e linfonodo para a dosagem das metaloproteases MMP-2, MMP-3, MMP-8, pro-MMP-9 e MMP-12 através da Tecnologia Luminex™ xMAP. (A) Gráfico de acompanhamento da espessura da lesão na orelha de camundongos Balb/C ao decorrer dos tempos de infecção (0 horas até 70 dias). Em (B) e (C) os resultados são mostrados como gráfico de linhas com símbolos sobrepostos em mediana com intervalo interquartil (comparação por grupo: teste de Kruskal-Wallis test com pós-teste de Bonferroni, $p < 0.005$). Em (B) temos a dosagem dos níveis de metaloproteases em pg/mL ao longo do tempo na orelha de camundongos Balb/c. E em (C) dosagem dos níveis de metaloproteases em pg/mL ao longo do tempo no linfonodo de camundongos Balb/c.

6.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE CÉLULAS DA LESÃO DA ORELHA E DO LINFONODO DE DRENAGEM NO MODELO MURINO DE LCL AO LONGO DO TEMPO

Para avaliar a funcionalidade da presença de metaloproteases em ambos os tecidos, foi realizado o ensaio de degradação nas matrizes tridimensionais fluorescentes, utilizando células extraídas da orelha infectada e do linfonodo de drenagem de camundongos Balb/c infectados com *L. braziliensis*. Para este ensaio, avaliamos a ação das células estimuladas ou não (controle) com *L. braziliensis* ou na presença de um inibidor de metaloproteases. Não foi possível observar diferença no nível de degradação entre as células da orelha e do linfonodo de drenagem (dados não mostrados), nem diferenças ao longo do tempo, o que pode ser explicado devido à baixa sensibilidade do ensaio. Dessa maneira, resolvemos avaliar se existia alguma influência da presença de *L. braziliensis*, ou do uso do inibidor de metaloproteases na degradação da matriz *ex vivo* através do cálculo do percentual da diferença.

No linfonodo (Figura 10a), o inibidor de metaloproteases foi capaz de reduzir a degradação em mais de 25% a partir do dia 14, demonstrando que as metaloproteases produzidas no linfonodo tem a capacidade de degradar a matriz extracelular e são talvez as únicas responsáveis pela reorganização tecidual neste sítio. Ademais, o estímulo com *L. braziliensis* foi capaz de inibir a ação das metaloproteases nas primeiras horas. Por outro lado, na orelha (Figura 10b), os dados mostraram que os inibidores de metaloproteases e o estímulo com *L. braziliensis* não foram capazes de inibir a degradação da matriz extracelular, indicando que deve existir outras moléculas capazes de degradar matriz extracelular neste sítio.

Com nossos resultados, concluímos que na amostra de linfonodo a *Leishmania* possui papel inibitório e é clara a capacidade de degradação de matriz de uma maneira metaloprotease dependente (Figura 10a), isso se reverte imediatamente a partir das 12 horas o que pode ser comprovado principalmente no resultado das lâminas onde o linfonodo já apresenta formação de folículo e apoptose a partir de 6 horas (Figura 3). Já na amostra de orelha esta relação não é clara e observamos um sinal mais antagônico do que o esperado (Figura 10b).

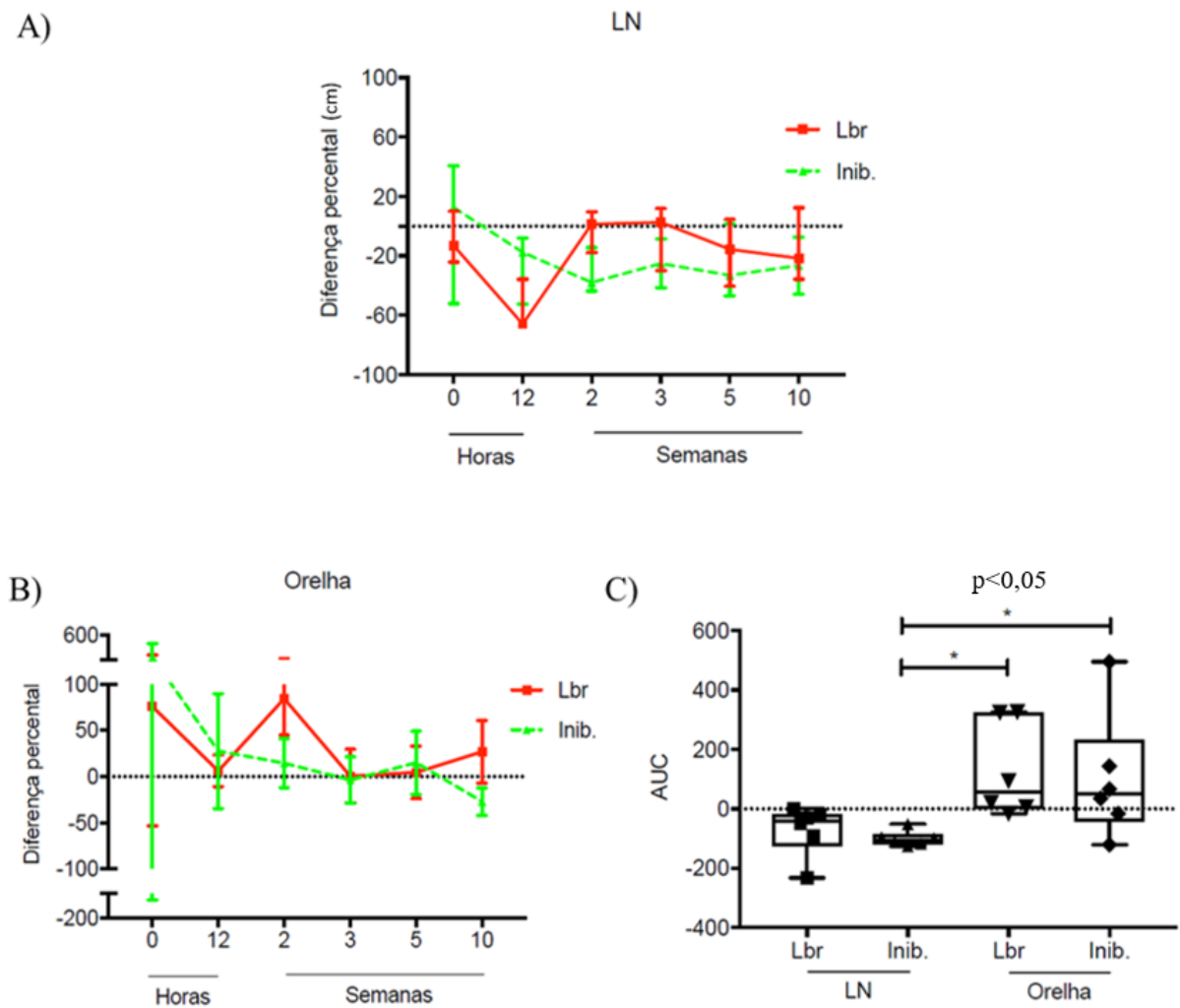


Figura 10. Avaliação da capacidade de degradação da matriz de células do linfonodo e da orelha no modelo murino de LCL. Neste ensaio foram utilizados 5 camundongos em cada tempo de infecção (0 horas até 10 semanas) e coletamos orelha e linfonodo para quantificação da degradação de matriz extracelular. Em (A) e (B) os resultados são mostrados como gráfico de linhas com símbolos sobrepostos em mediana com intervalo interquartil. (C) Cada ponto representa dados de cada ponto de infecção (0 horas, 12 horas, 2 semanas, 3 semanas, 5 semanas e 10 semanas) e os resultados são mostrados como Box e Whisker com sobreposição de pontos, representando a mediana, os quartis inferior e superior e os valores máximo e mínimo por grupo (comparação de grupo da AUC: Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Nosso estudo foi pioneiro no acompanhamento histopatológico da lesão e quantificação longitudinal semanal de citocinas pró e anti-inflamatórias, metaloproteases e de degradação de matriz extracelular no modelo de LCL murino. Através dos nossos resultados pudemos detalhar cronologicamente o perfil inflamatório e de degradação de matriz na progressão da LCL. Encontramos um aumento nos níveis das citocinas IL-4 e IL-6, assim como das metaloproteases analisadas (MMP2, MMP3, MMP8 e pro-MMP9) durante a infecção, principalmente no pico de espessura da lesão. Porém, tivemos resultados diferentes entre as análises do tecido de orelha e linfonodo, onde os inibidores de metaloproteases não foram capazes de inibir a degradação da matriz extracelular na orelha. Este resultado indica que possivelmente existem outras moléculas capazes de degradar matriz extracelular neste sítio e que mais estudos são necessários.

No presente estudo, através de análise histopatológica, encontramos amastigotas de *L. braziliensis* em grande quantidade no tecido de orelha desde os 21 dias de infecção até no momento da completa cicatrização da lesão (70 dias). O que difere do que já foi descrito por MOURA *et al.* (2015) através de ensaio de diluição limitante, onde não foi detectada a presença de parasitos viáveis na orelha a partir da oitava semana (estágio tardio da infecção). Essa divergência pode ser explicada devido a diferença de sensibilidade entre as técnicas de quantificação de cara parasitária. A análise histopatológica do corte, que é retirado e fixado logo em seguida, oferece uma visão mais fidedigna do que podemos encontrar na amostra naquele ponto. Este resultado ressalta a importância de mais estudos para avaliar a viabilidade e a influência destes patógenos no processo inflamatório que persiste até a cura clínica no modelo murino de LCL. No tecido de linfonodo não conseguimos detectar a presença de parasitos, provavelmente devido a limitações da técnica utilizada para este tipo de amostra.

Na literatura está descrita a presença de um infiltrado celular dérmico denso e difuso, com a presença, principalmente, de neutrófilos e macrófagos no início da formação da lesão (BIDDLESTONE *et al.*, 1994; HANDLER *et al.*, 2015), corroborando com o perfil inflamatório que observamos no presente estudo. Num momento mais tardio é relatada a presença de um grande número de células plasmáticas (MEHREGAN *et al.*, 1997, HANDLER *et al.*, 2015) e, mesmo após o tratamento e a cura clínica os pacientes podem continuar apresentando um processo inflamatório moderado com níveis elevados das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 (VIANA *et al.*, 2013, HANDLER *et al.*, 2015).

Em nossos achados encontramos o aumento dos níveis de IL-4 e IL-6 que acompanham o aumento e a regressão da espessura da lesão, coincidindo suas quantificações mais altas com o pico da espessura da orelha. Este comportamento da IL-4 corrobora com o que já foi descrito por DeKrey *et al.*, 1998, demonstrando um papel importante desta citocina na regulação da susceptibilidade à infecção por *L. braziliensis* nos camundongos Balb/c. Na literatura a IL-6 é descrita como uma citocina pleiotrópica atuando tanto como uma citocina anti-inflamatória quanto uma citocina pro-inflamatória (SCHELLER *et al.*, 2011). É comprovado também sua relação com o aumento da diferenciação de células Th2 e supressão da resposta Th1 (DIENZ; RINCON, 2009).

Estudos relataram que houve diminuição na produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 em camundongos nocaute para IL-6 (IL-6^{-/-} BALB/c) infectados por *L. major*, mas não houve diferença significativa entre o tamanho da lesão e carga parasitária nos camundongos com deficiência de IL-6 e camundongos selvagens (TITUS *et al.*, 2001). A susceptibilidade à doença ou a incapacidade de controlar o desenvolvimento da lesão está associada a uma resposta regulatória com a produção concomitante de IL-10 assim como expressão de citocinas Th2 como IL-4, IL-6 (na LCL) e TGF- β (MASPI *et al.*, 2016; NYLÉN *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2002). Contudo, Hurdal R *et al.*, 2014 demonstra que as funções relacionadas à IL-4 não são estáticas, variando com base em seu entorno, momento de produção, com as células que o produzem e as células sobre o qual exerce seus efeitos. O que pode explicar o comportamento que evidenciamos, com os altos níveis de IL-4 no pico da lesão na orelha e ainda assim culminando na resolução da lesão no fim do período experimental. A resposta imunológica e a cicatrização da lesão demonstram envolver diversas moléculas, como as citocinas e metaloproteases, que juntas orquestram este balanço e determinam a gravidade/progressão da doença.

No nosso modelo de LCL, encontramos a partir dos 14 dias de infecção um aumento das enzimas dosadas na orelha (MMP12, MMP2, MMP3, MMP8 e pro-MMP9) atingindo o ponto máximo de produção aos 35. No dia 49 (onde temos o início do aparecimento do arcabouço de matriz extracelular) os níveis das enzimas caem simultaneamente, principalmente a MMP8 e a pro-MMP9. Porém, esses níveis voltam a aumentar nos dias 56 e 63, sem ressurgimento de lesão. No último dia de infecção (70 dias) os níveis de metaloproteases voltam a cair drasticamente, com valores semelhantes aos dosados no início da infecção. Estudos sugerem que o aumento da disseminação do parasito e a progressão da doença para uma fase ulcerativa pode estar associada ao aumento dos níveis de MMP-9 (MURASE *et al.*, 2018; MARETTI-MIRA *et al.*, 2011a). Porém, analisando nossos resultados, onde possuímos um

aumento da migração celular e reepitelização em conjunto com o aumento das metaloproteases, principalmente a pro-MMP9, no momento da cicatrização, podemos sugerir que num modelo de resolução (murino) a MMP9 está contribuindo ativamente nessa migração celular e reparo tecidual. Além disso, a oscilação das outras MMPs, juntamente com a MMP9, indica que as metaloproteases possuem um papel ainda não muito bem elucidado na progressão e resolução da lesão na leishmaniose cutânea.

As metaloproteases de matriz são uma família de endopeptidases envolvidas no processo regenerativo da pele (MIRASTSCHISKI *et al.*, 2004; MARETTI-MIRA *et al.*, 2010). Além de degradar as moléculas da matriz extracelular, as MMPs podem modular a atividade de citocinas e fatores de crescimento através de diferentes mecanismos (RAVANTI *et al.*, 2000; VAN DEN STEEN *et al.*, 2000; KARSDAL *et al.*, 2002). Diversos estudos apontam a importância da MMP-9 e MMP-2 na reepitelização e cicatrização de lesões cutâneas, pois são responsáveis por possibilitar a migração de queratinócitos através da matriz extracelular da derme lesada (SALO *et al.*, 1994; MAKELA *et al.*, 1999). Estes dados reforçam os resultados que encontramos de aumento da presença de pro-MMP9 no momento da cicatrização e o seu papel contribuindo para migração celular e reparo.

Dados de expressão gênica *in situ* demonstram que a expressão MMP-1, MMP-3 e MMP-9 se encontram particularmente aumentadas nas lesões de LCL em comparação com a pele normal (CAMPOS *et al.*, 2014). A MMP-1 e MMP-3 têm sido mais associadas ao remodelamento de matriz e a secreção desregulada de MMP-9 relacionada a processos patológicos (MURPHY *et al.*, 2008; MULLER *et al.*, 2008). Estudos comprovaram que a infecção por *L. braziliensis* aumentou os níveis de atividade da MMP-9 nos sobrenadantes das monoculturas de macrófagos humanos, o que sugere que a infecção por *L. braziliensis* pode estimular os macrófagos a aumentar sua atividade migratória (MARETTI-MIRA *et al.*, 2011). Porém, estes estudos não observaram de maneira específica o balanço de metaloproteases em conjunto com a degradação de matriz extracelular na progressão da Leishmaniose cutânea, histopatologicamente e quantitativamente. Em nosso trabalho temos uma visão mais ampla e fidedigna do painel que está sendo montado durante toda a doença, incluindo o momento da cicatrização. Podemos assim inferir que o papel da pro-MMP9 neste contexto está mais relacionado a atividade migratória e reepitelização.

Avaliando a capacidade da degradação da matriz extracelular por células do linfonodo e da orelha observamos que, no linfonodo, o inibidor de metaloproteases foi capaz de reduzir a degradação a partir da segunda semana de infecção, demonstrando que estas metaloproteases produzidas no linfonodo possuem capacidade de degradar a matriz extracelular

e podem ser as únicas responsáveis pela reorganização tecidual neste sítio. Porém, o mesmo não foi observado na orelha, onde os inibidores não foram capazes de inibir a degradação da matriz extracelular, indicando que possivelmente existem outras moléculas capazes de degradar matriz extracelular neste sítio.

Ademais, em nossos achados nas lâminas de Picro-sírius (marcando as fibras de colágeno) e fotografias de microscopia eletrônica de transmissão dos tecidos de orelhas de camundongos infectados, observamos uma dispersão gradual da matriz extracelular. Esta dispersão, a partir do dia 49 até o dia 56, apresentou uma conformação semelhante a um arcabouço, onde as fibras de colágeno demonstravam um comportamento similar a uma rede, envolvendo as células ao longo do tecido. A formação deste arcabouço coincide com o momento em que se dá início ao reparo do tecido, indicando então uma possível associação entre o comportamento e distribuição da matriz extracelular e o sucesso do reparo tecidual no modelo murino.

É importante ressaltar que mais estudos são necessários para entender quais moléculas específicas responsáveis pelo desencadeamento do processo de lesão, degradação da matriz extracelular e atraso da cicatrização tanto no modelo murino como no humano.

8 CONCLUSÃO

Nosso estudo possibilitou a caracterização e quantificação cronológica da degradação da matriz extracelular, das metaloproteases e da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo murino de LCL. Nossos achados indicam que mais estudos são necessários para compreender o processo de degradação de matriz extracelular e cicatrização da lesão. Encontramos, também, a presença de amastigotas na lesão desde o dia 21 de infecção até a cicatrização da lesão, o que ressalta a necessidade de mais estudos para avaliar a viabilidade e a influência destes patógenos no processo inflamatório que persiste até a cura clínica neste modelo. Destrinchando mais a fundo estes perfis será possível fornecer opções alternativas de vias e moléculas alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L., *et al.*, Analysis of expression of FLI1 and MMP1 in American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* infection. **Infect. Gene. Evol.**, v. 49, p. 212-220, 2017.
- ANDRADE, B. B. *et al.*, Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 2-3, p. 122-127, 2007.
- ANTOINE, J. C., *et al.*, The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **T. Microbiol.**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- AUMAILLEY, M.; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. **J. Mol. Med.**, v.76, p. 253-265, 1998.
- BARRAL, A. *et al.*, Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 256-259, 1995a.
- BARRAL, A. *et al.*, Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 5, p. 587-592, 1992.
- BARRAL, A. *et al.*, Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int. J. Dermatol.**, v. 34, p. 474-479. 1995b.
- BARRAL M. *et al.*, Immunology of cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n. 3, p. 173-191, 2017.
- BIDDLESTONE, L. R., *et al.*, A clinico-pathological study of cutaneous leishmaniasis in British troops from Belize. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 88, p. 672-676, 1994.
- BIRKEDAL-HANSEN, H, *et al.*, Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. In O. Biol. Med.**, v. 4, p. 197-250, 1993.
- BITTENCOURT, A. L. *et al.*, Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 53-59. 1990.
- BRASIL, Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev. São Paulo** , v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Casos de leishmaniose tegumentar por regiões brasileiras**, 2000 a 2015, 2015. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LT-Graficos-e-Mapas.pdf>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 179p.
- CALEY, M.P. *et al.* Metalloproteinases and Wound Healing. **Adv. W. C.**; v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015.
- CAMPOS, T.M., *et al.*, Matrix metal- loproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.** v. 8, e3282, 2014.

- CARVALHAL, D.G., *et al.*, The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. **Exp. Parasit.**, v. 107, n. 3-4, p. 189-199, 2004.
- CHANG, C.; WERB, Z., The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **T. in Cell Biol.**, v. 11, p. S37–S43, 2001.
- COSTA, J. M. *et al.*, Diffuse cutaneous Leishmaniasis (dcl) in Brazil after 60 years of your first description. **Gaz. Med. Bahia**, v. 79, n. 5, p. 16–24, 2009b
- DANIELSEN, P.L. *et al.*, Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. **Surgery**, v. 150, p. 897–906. 2011.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Vet. Parasitol.**, v. 149, n. 3-4, p. 139–146, 2007.
- DARMSTADT, G.L. *et al.* Picture of the month. Cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Dis. Child.**, v. 147, p. 1339-1340, 1993.
- DESJEUX P, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- DE WEVER, O. *et al.* Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int. J. Can.**, v. 123, p. 2229–2238, 2008.
- DEKREY, G.K. *et al.* Analysis of the immune responses of mice to infection with Leishmania braziliensis. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.
- DIENZ, O.; AND RINCON, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. **Clin. Immunol.** v. 130, n. 1, p. 27-33, 2009.
- ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.
- FRANTZ, C. *et al.*, The extracellular matrix at a glance, **J. C. Sci.**,v. 123, p. 4195-4200, 2010.
- GONG Y, *et al.* Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 9, p. 3012-24, 2008.
- GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GONZALEZ, KADIR *et al.*, Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by Leishmania Viannia panamensis in Panama. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 60, e8, 2018.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic Leishmaniasis and approaches to disease control. **Internat. J. For Parasitol.**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.
- HAMILL, K. J., KLIIGYS, K., HOPKINSON, S. B. & JONES, J. C. R. Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. **J. C. Sci.**, v. 122, p. 4409–17, 2009.
- HANDLER MZ, *et al.*, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 73, n. 6, p. 897-908, 2015.

- HANDMAN, E; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18. N. 8, p. 332-334, 2002.
- HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v. 161, n. 2, p. 179-183, 2014;
- KAMHAWI, S. *et al.*, The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 14, p. 1765-1773, 2000.
- RAVANTI, L.; KAHARI, V.M. Matrix metalloproteinases in wound repair (review), **Int. J. Mol. Med.**, v. 6, p. 391– 407, 2000.
- MUIZNIEKS, L.D. *et al.* Structural disorder and dynamics of elastin, **Biochem. C. Biol.**, v. 88, p. 239–250, 2010.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world leishmaniasis the neotropical leishmania species. **T. W. Micro. And Microb. Infect.**, v. 5, n. 9, p. 242-266, 1998.
- LEBLEU, V.S., *et al.*, Structure and function of basement membranes. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, n. 9 , p. 1121-1129, 2007.
- LIARTE, D.B. *et al.*, QBC for the diagnosis of human and canine American visceral Leishmaniasis: preliminary data. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.** v. 34, p. 577-581, 2001.
- KARSDAL, M.A. *et al.*, Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis, **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 44061– 44067, 2002.
- MACHADO, P. R. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer, **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 69-73, 2002.
- MAKELA, M. *et al.* MMP-9 from TNF alpha-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation? **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 253, p. 325– 335, 1998.
- MARETTI-MIRA, A.C. *et al.* MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal Leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 119, p. 160–164, 2011a.
- MASPI, N. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathog. Glob. Health**, v. 110, p. 247–260, 2016.
- MCGOWAN, K. A.; MARINKOVICH, M. P. Laminins and human disease. **Microsc. Res. Tech.**, v. 51, p. 262–279, 2000.
- MEHREGAN, D.R. *et al.* Histopathology of cutaneous leishmaniasis. **Gulf. J. Dermatol. Venereol.**, v. 4, p.1-9, 1997.
- MIRASTSCHISKI, U. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor GM 6001 attenuates keratinocyte migration, contraction and myofibroblast formation in skin wounds. **Exp. C. Res.**, v. 299, n. 2, p. 465–475, 2004.
- MOSES, M.A., *et al.* Temporal study of the activity of matrix metallo-proteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. **J. C. Biochem.**, v. 60, p. 379–386, 1996.

- MOURA, T. R. *et al.*, Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. and Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.
- MULLER, M. *et al.*, Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. **Diabet. Med.**, v. 25, p. 419–426, 2008.
- MURASE, L.S. *et al.*, The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. **Parasitology**, v. 145, p. 1499–1509, 2018.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol. Asp. Med.** v. 29, p. 290–308, 2008.
- MURRAY, H. W. *et al.*, Advances in leishmaniasis. **L.** , v. 366, p. 1561-1577. 2005.
- NEVES, L.O. *et al.*, Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 86, n. 6, p. 1092-1101. 2011.
- NOVAIS, F. O. *et al.*, Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 94-101, 2015
- NYLÉN, SUSANNE; GAUTAM, SHALINI. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **J. G. Inf. Dis.** v. 2, p. 135-46, 2010.
- OLIVEIRA, C. I; BRODSKYN, C, The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **T. Immunobiol.**, v. 3, n. 145, p. 1-9, 2012.
- OPAS. Organização Pan-Americana da saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017 Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.
- OPAS. Organização Pan-Americana da saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019 Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf>
- P.E. VAN DEN STEEN, *et al.*, Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact, **B.** , v. 96, p. 2673–2681, 2000.
- PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect.**, v. 69, n. 1, p. 10-18, 2014.
- REICHEL, C.A., *et al.*, Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 864–874. 2008.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **L. Infect. Dis.**, v. 7, n. 6, p. 581–596, 2007.
- RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infect. Ag. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995.
- ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Dev. Biol.** v. 341, p. 126–140, 2010.

- SACKS DL, PERKINS PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417–1419, 1984.
- SALO T, *et al.*, Expression of matrix metallo- proteinase-2 and - 9 during early human wound healing. **Lab. Invest.**, v. 70, p.176–182, 1994.
- SANTOS, J. B., *et al.* Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 10, p. 1793-1796, 2004.
- SCHELLER J, *et al.* The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Mol. Cell. Res.**, v. 1813, n. 5, p. 878–88, 2011.
- SCORZA, B. M., *et al.*, Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int. J. Mol. Sci.**, V. 18, n. 6, p. 1296, 2017.
- SESAB. SUS. **Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana (LTA)**. BA. n. 1, 27 dezembro de 2016.
- SILVA-ALMEIDA, M. *et al.* Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. **Vet. Res.**, v. 43, p. 1–9, 2012.
- SMITH, M. L., *et al.*, Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. **PLoS Biol.** v. 5, e268. 2007.
- THEOCHARIS, A. D., *et al.*, Extracellular matrix structure. **Adv. D. Deliv.**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- MARETTI-MIRA AC, *et al.*, Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. **Clin. Exp. Immunol.** v. 163, p. 207–14, 2011.
- THEOCHARIS, A.D. *et al.*, Extracellular matrix: a functional scaffold. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 97, p. 4-27, 2016.
- TITUS, R.G., *et al.*, Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 5189-5192, 2001.
- TOMLINSON, M.L., *et al.*, Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. **Mech. Dev.** v. 125, p. 1059–1070, 2008.
- TSANG, K. Y., *et al.*, The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. **C. Tis. Res.**, v. 339, p. 93-110, 2010.
- TURNER, C.T., *et al.*, Granzyme B in skin inflammation and disease. **Mat. biol.**, v. 75-76, p. 126-140, 2017.
- VIANA AG, *et al.*, Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. **An. Bras Dermatol.**; v. 88, p. 32-40, 2013.
- WISE, S. G.; WEISS, A. S. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. C. Biol.* v. 41, p. 494-497, 2009.

WOESSNER JR., J.F., The family of matrix metalloproteinases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 732, p. 11–21, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leish. G. H. O** data retrieved from https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/2017.