

PRODUÇÃO DE METALOPROTEASE 9 POR LEUCÓCITOS ISOLADOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA QUANDO ESTIMULADOS POR ANTÍGENOS DE *Leishmania*

Dafne Monteiro Piovesana (PIBIC/FA), Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose (Coorientadora), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora)
E-mail: tgvsilveira@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Saúde pública, saúde coletiva

Palavras-chave: leishmaniose cutânea, metaloproteinases de matriz, leucócitos

Resumo:

A leishmaniose cutânea é caracterizada pela formação de lesões ulceradas. Durante o processo inflamatório, as células mononucleares do sangue periférico produzem citocinas que induzem a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). Com a produção exacerbada de MMP 9 ocorre a ruptura da membrana e o desenvolvimento de úlcera cutânea, uma vez que, degradam o colágeno tipo IV. O objetivo desse estudo foi determinar a produção de MMP 9 por leucócitos isolados no sangue periférico e no soro de pacientes com leishmaniose quando comparado com o grupo de pacientes com lesão não diagnosticados com leishmaniose. Os dados mostram que a MMP 9 no soro de pacientes com leishmaniose encontra-se em maior quantidade do que de pacientes com outros tipos de lesão.

Introdução

As leishmanioses são doenças negligenciadas no mundo e apresentam dificuldades no controle e tratamento mesmo com grandes avanços científicos (1). Essa doença é transmitida por flebotomíneos fêmeas, conhecidos como mosquito-palha. No Brasil, prevalece a *Leishmania (Viannia) braziliensis* que desenvolve lesões cutâneas e mucosas (2).

A leishmaniose cutânea é caracterizada pela presença de lesões ulceradas, as quais apresentam infiltrados inflamatórios com a presença de macrófagos. Ao ocorrer o processo patogênico, monócitos migram para sítios inflamatórios e secretam citocinas como TNF que induz a expressão de MMPs (3).

As MMPs são enzimas dependente de zinco produzidas por linfócitos, granulócitos e macrófagos ativados, sua função é degradar proteínas da matriz extracelular com o objetivo de erradicar a infecção estimulando a

migração de células efetoras para o sítio inflamatório, porém, a inflamação descontrolada pode causar dano tecidual (3).

A MMP 9, conhecida como gelatinase B, degrada um dos principais componentes da membrana basal, o colágeno tipo IV que induz a ruptura da membrana basal e o desenvolvimento de úlcera cutânea (4). Diante disso, o objetivo desse estudo é a determinação da produção de MMP 9 por leucócitos isolados no sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea quando estimulados com ASL, assim como a quantificação da mesma no soro de pacientes.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (parecer: 2.927.000).

Pacientes e amostras

Neste estudo, foram coletadas 27 amostras de sangue de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC) com suspeita de leishmaniose cutânea. O diagnóstico de leishmaniose cutânea foi feito por exame direto da escarificação da lesão e imunofluorescência para pesquisa de anticorpos contra a *Leishmania*. Um grupo controle de pacientes com lesão sem diagnóstico de leishmaniose foi formado. Ambos os grupos foram pareados quanto a idade e sexo. Os pacientes foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Produção do antígeno solúvel de Leishmania (ASL)

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 5 mM e agitadas em vortex. Após a centrifugação, o sedimento foi novamente ressuspense em Tris-HCl 5 mM e agitado novamente. Esta suspensão foi sonicada, centrifugada e o sobrenadante alíquotado e armazenado a -80°C. A dosagem de proteínas nos antígenos foi feita em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite - 2070,5 µg/mL.

Estimulação de mononucleares do sangue periférico com SLA

Mononucleares do sangue periférico foram separados com Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich Co. LLC). O procedimento foi conduzido conforme instruções do fabricante. As células (1x10⁶ células/mL) foram lavadas e cultivadas em RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 10 IU/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina por 24 horas na ausência

e presença de ASL numa concentração de 5 ug/mL. O sobrenadante das culturas foi coletado e preservado a -20°C .

Quantificação de MMP9 por ELISA

O MMP 9 no sobrenadante das culturas e no soro de pacientes foi quantificado por kit Human MMP9 ELISA, segundo recomendações do fabricante.

Resultados e Discussão

A MMP 9 pode influenciar no aparecimento de lesões em pacientes com leishmaniose cutânea. Dessa forma, foi avaliado a concentração de MMP 9 nas culturas controles (CC), nas estimuladas (E) com ASL e no soro (S) das amostras coletadas.

Durante o período de fevereiro à julho de 2021 foram obtidas 27 amostras os quais apresentaram idade média de $49,88 \pm 13,85$, sendo 18 do sexo masculino (66,66%) e 9 do sexo feminino (33,34%). Destas, 9 foram positivas para leishmaniose. Desses, quatro pacientes tiveram as células mononucleares periféricas isoladas e estimuladas ou não por ASL. Os soros dos 9 pacientes foram analisados para avaliar a MMP 9. Um grupo controle de quatro pacientes com lesão sem o diagnóstico de leishmaniose foi formado pareando o sexo e a idade do grupo de pacientes com leishmaniose.

A concentração da MMP 9 nas culturas de leucócitos não estimuladas e estimuladas por ASL nos pacientes controles não foi diferente, sendo de $3,18 \pm 2,09$ e $3,41 \pm 1,89$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente ($p=0,6789$). Nas culturas de leucócitos não estimuladas de pacientes com leishmaniose a concentração foi de $10,41 \pm 8,09$ $\mu\text{g/mL}$ e nas estimuladas foi $8,36 \pm 4,75$ $\mu\text{g/mL}$, sem diferença estatística ($p=0,8749$). A concentração no soro de pacientes com leishmaniose foi seis vezes maior que a de pacientes do grupo controle, sendo $190,02 \pm 99,35$ e $29,54 \pm 16,46$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, embora não se tenha diferença estatística ($p=0,875$) (Figura 1).

A ausência de diferença estatística pode ser atribuída ao pequeno número de amostras e apesar de preliminares. A MMP 9 no soro parece estar mais elevada em pacientes com leishmaniose quando comparado a pacientes com outros tipos de lesão. Não houve diferença significativa entre as culturas estimuladas e não estimuladas por ASL, contudo, as amostras de soros apresentaram diferenças em relação às culturas.



Figura 1 – Quantificação da MMP-9 no soro e na cultura de polimorfonucleares estimuladas ou não com antígeno solúvel de *Leishmania* de pacientes diagnosticados com leishmanioses em comparação à pacientes que apresentavam outros tipos de lesões. As barras representam o desvio padrão.

Conclusões

Os dados sugerem que a MMP 9 está em maior quantidade no soro de pacientes com leishmaniose do que de pacientes com outros tipos de lesão. A ampliação do número de amostras é fundamental para validação desse resultado.

Agradecimentos

Ao laboratório de imunologia clínica da Universidade Estadual de Maringá e a Fundação Araucária (FA).

Referências

1. World Health Organization. **Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. WHO Tech Rep Ser. 2010;949(March):22–6.
2. Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [Internet]**. 1. ed. Ministério da Saúde, editor. Brasília (DF); 2017. 1-190 p. Available from: <https://goo.gl/vZqXJE>
3. CAMPOS, TMC. **Produção de metaloproteínase 9 por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea**. 2012.
4. Campos TM, Passos ST, Novais FO, et al. **Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis**. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11).