

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE 2 E METALOPROTEASE 9 EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Rodrigo Mayer (PIC), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose (Orientador), e-mail: dsslnonose2@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde / Medicina II – Doenças infecciosas e parasitárias

Palavras-chave: Leishmaniose, Metaloproteases, Biomarcadores

Resumo:

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas que podem evoluir para diferentes formas dependendo de determinados fatores, como a ação de enzimas chamadas metaloproteases (MMPs): MMP-9 e MMP-2. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão da MMP-2 e MMP-9 em lesões de dois grupos distintos: pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea e pacientes com lesões de outras origens etiológicas (grupo controle). Para isso, o RNA do raspado das lesões foi extraído e convertido em cDNA, primers específicos das MMPs foram usados na reação em cadeia da polimerase e o produto da amplificação foi analisado em gel de agarose. Os resultados obtidos demonstraram que as lesões de pacientes com leishmaniose apresentaram menor expressão de MMP-9 e MMP-2 quando comparadas a pacientes com lesões de outras etiologias. Esse perfil de expressão distinto reforça o papel dessas metaloproteases como biomarcadores da leishmaniose.

Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas que atingem o ser humano através de um vetor hematófago que carrega em seu aparelho digestivo o parasito do gênero *Leishmania* e durante o repasto sanguíneo transmite esse parasito para o ser humano que passa a ser seu novo hospedeiro. No Brasil, a leishmaniose é uma doença recorrente.

A leishmaniose possui diferentes formas clínicas, sendo elas a tegumentar, a visceral, e a cutâneo-mucosa. A disseminação de sua infecção pode estar relacionada com a atividade de algumas enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, as metaloproteases (MMPs). Essas são um grupo de endopeptidases dependentes de zinco, As MMPs são secretadas por diversas células e possuem importante papel no comportamento celular. Essas enzimas possuem inibidores chamados

TIMPs que controlam a atividade das MMPs. O desequilíbrio nesse controle influencia na progressão de várias doenças, assim como na progressão da leishmaniose (VIDAL et al. 2011).

O agravo do quadro de leishmaniose está relacionado com a atividade exercida pelas MMPs, principalmente a MMP-9 e MMP-2. Em culturas de macrófagos, a ativação de MMP-9 foi consideravelmente aumentada quando havia infecção por *Leishmania braziliensis*. Essa, na leishmaniose do tipo visceral, apresenta-se em níveis elevados quando o prognóstico é ruim (DE OLIVEIRA et al. 2013). Quanto a MMP-2, pacientes que apresentaram uma boa resposta ao tratamento e não tiveram uma piora do quadro, apresentaram também uma maior taxa de MMP-2 e TIMP-2 (inibidor de MMP-2), algo que não aconteceu com pacientes que evoluíram mal (MARETTI-MIRA et al. 2011).

Portanto, há evidências de que o sucesso do tratamento terapêutico depende de como a expressão das MMPs e seus inibidores atuam na doença. O conhecimento das relações que as MMPs possuem com o agravo de infecções abrem novos caminhos para a melhora no manejo dos tratamentos disponíveis para leishmanioses.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

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

Design do estudo

Os pacientes incluídos nesse estudo foram encaminhados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá para fazerem o diagnóstico Laboratorial da leishmaniose cutânea. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo é um caso-controle no qual dois grupos são analisados e comparados: o grupo dos casos (amostras de pacientes com leishmaniose na sua forma cutânea, positivos para exame direto ou imunofluorescência indireta) e o grupo controle (amostras de pacientes com lesões de outras etiologias, negativados no exame direto e imunofluorescência indireta). Durante o estudo os pacientes que proveram as amostras foram contatados para que pudesse ser feito o acompanhamento da evolução da doença.

Cálculo amostral

Considerando uma prevalência máxima superestimada de leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea e mucosa) no Paraná de 0,5% (201 casos em 201620 em uma população de 11.320.892 habitantes 21), um intervalo de confiança de 99% e uma margem de erro de 5%, o mínimo amostral para cada grupo será de 17 pacientes, levando em consideração

20% de perda. O tamanho amostral foi calculado pelo software OpenEpi, Version 3, open source calculator—SSPropor.

Extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) a partir das amostras de lesão

RNAs das escarificações foram extraídos com uso do TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop™ Lite. A integridade do RNA extraído foi avaliada em eletroforese de gel de agarose. 1 µg de RNA foi usado para sintetizar a primeira fita de cDNA a partir de Oligo e SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) com a realização da transcrição reversa.

Expressão de MMP-9 e MMP-2 pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O cDNA de MMP-9, MMP-2 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram amplificados utilizando primers desenhados por Yu et al. (2019). Para cada alvo genético uma reação de PCR convencional com adição de 0,50 µM de cada primer, 0,25 µM de nucleotídeos, Taq polimerase, 1,52 µM cloreto de magnésio e 3 µL de cDNA em um volume final de 25 µL foi feita. O mix foi submetido a 35 ciclos de amplificação em termociclador. A eletroforese do DNA foi feita em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo e a visualização sob luz ultravioleta. O alvo genético GAPDH foi utilizado como controle interno.

Resultados e Discussão

Infelizmente em função da pandemia da COVID-19 o número de pacientes encaminhados ao LEPAC para o diagnóstico da leishmaniose reduziu e o estudo foi conduzido com oito amostras no grupo de pacientes com leishmaniose e oito amostras no grupo controle.

Cada amostra foi analisada em relação a sua expressão de MMP-9, MMP-2 e GAPDH. Das 16 amostras analisadas, apenas duas amostras não tiveram sucesso na extração e amplificação do material genético com ausência de amplificação para o alvo GAPDH, sendo uma de cada grupo. Com relação a expressão da MMP-9, no grupo controle 71,4% (5/7) das amostras expressaram MMP-9, enquanto que 28,6% (2/7) dos pacientes diagnosticados com leishmaniose apresentaram a expressão da mesma. A MMP-2 foi expressa em 71,4% (5/7) das amostras controle, enquanto que nenhuma amostra dos pacientes com leishmaniose expressou a mesma (0/7). Os resultados mostram que houve uma maior expressão tanto da MMP-9 quanto da MMP-2 nas amostras do grupo controle em relação ao grupo dos casos e isso está em discordância com a literatura, na qual amostras de pacientes com leishmaniose apresentaram uma expressão maior da MMP-9 (DE OLIVEIRA et al. 2013; MURASE et al. 2018) e as amostras de pacientes em processo de reepitelização (recuperação) apresentariam uma expressão maior da MMP-2 (MARETTI-MIRA et al. 2011; MURASE et al. 2018).

Esta discrepância pode ter ocorrido porque os trabalhos mencionados avaliaram a expressão das MMPs no soro, enquanto que o presente trabalho avaliou as mesmas diretamente na lesão. Isso sugere que na leishmaniose, localmente a expressão de MMP-2 e MMP-9 é controlada e que sistematicamente (soro) elas são super expressas.

Conclusões

Amostras de lesão de pacientes diagnosticados com leishmaniose tiveram uma menor expressão de MMP-9 e MMP-2 quando comparado com pacientes que possuíam lesões de outras origens etiológicas. Esse perfil de expressão claramente distinto reforça o papel dessas metaloproteases como biomarcadores da leishmaniose, embora estudos com maior número amostral e que elucidem a associação dessas metaloproteases com a patogênese das leishmanioses se fazem necessários.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os membros do laboratório de imunologia clínica da UEM, principalmente a minha orientadora Daniele por todo o auxílio e apoio prestados.

Referências

DE OLIVEIRA, F. A. et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2013.

MARETTI-MIRA, A. C. et al. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 163, n. 2, p. 207–214, 2011.

MURASE, L. S. et al. The role of metalloproteases in Leishmania species infection in the New World: A systematic review. **Parasitology**, v. 145, n. 12, p. 1499–1509, 2018.

VIDAL, R. et al. Metaloproteínases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82–88, 2011.

YU, Y. et al. Amphiregulin promotes trophoblast invasion and increases MMP9/TIMP1 ratio through ERK1/2 and Akt signal pathways. **Life Sciences**, v. 236, p. 1-11, 2019.