

QUANTIFICAÇÃO DE METALOPROTEASE 9 NO SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Iasmin Nobre Barbosa (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dafne Monteiro Piovesana, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose (Co-orientadora), e-mail: dssllnonose2@uem.br, Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora), e-mail: tgvsilveira@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde da Saúde/Maringá, PR.

Área: Medicina II. **Subárea do conhecimento:** Saúde pública, saúde coletiva

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

Resumo

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo. São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas, conhecido popularmente como mosquito-palha. Essa doença pode se manifestar na forma visceral, cutânea e mucosa. A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões com infiltrados inflamatórios que ativam respostas imune, como a produção de citocinas que induzem o aumento dos níveis de metaloproteases (MMPs). A MMP-9 degrada o principal componente da membrana basal, o colágeno tipo IV. Dessa forma, este trabalho tem intuito de quantificar a MMP 9 no soro de pacientes com leishmaniose cutânea (aprovado pelo comitê de ética: 2.927.000). Para isso foram selecionados dois grupos de pacientes: pacientes com o diagnóstico laboratorial de LC e pacientes com lesões de outras etiologias. O sangue total foi coletado e o soro separado de ambos os grupos. A quantificação da MMP 9 foi feita por método imunoenzimático. 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, sugerindo o envolvimento da MMP- 9 com a patogênese da LC.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de grande impacto na saúde pública. Os dados epidemiológicos mostram que o desmatamento das florestas sul americanas influenciaram a adaptação da *Leishmania* através do parasitismo de novos vetores e hospedeiros contribuindo com o aumento das infecções no perímetro urbano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A infecção ocorre a partir da picada de insetos flebotomíneos fêmeas, conhecidos como mosquito-palha, contaminados com parasitos do gênero *Leishmania* durante o repasto sanguíneo (CONCEIÇÃO, 2015). No Brasil, predomina a leishmaniose tegumentar caracterizada por lesões ulceradas de bordas elevadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Durante o processo patológico, os monócitos circulantes no sangue são recrutados para os sítios inflamatórios e iniciam a secreção de citocinas como o fator de

necrose tumoral. Essa é capaz de destruir células através de vários mecanismos, entre eles, indução de óxido nítrico, aumento de citotoxicidade e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (CAMPOS, 2012).

As MMPs são enzimas proteolíticas produzidas por linfócitos, granulócitos e macrófagos ativados, e são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular com o objetivo de erradicar a infecção (LEBER; BALKWILL, 1998).

A MMP 9, conhecida como gelatinase B, degrada um dos principais componentes da membrana basal, o colágeno tipo IV, isso pode causar degradação excessiva da matriz extracelular e consequentemente dano tecidual, o desenvolvimento de úlcera cutânea (CAMPOS et al., 2014).

Diante dessas evidências, sugere-se que a modulação da produção e a atividade de MMP 9 podem estar ligada à patogênese da leishmaniose. Com conhecimentos mais aprofundados destes processos é possível contribuir para a antecipação clínica da resposta terapêutica e desfecho da doença, assim como para avaliação da MMP 9 como biomarcador da leishmaniose. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar concentração de MMP 9 no soro de pacientes com leishmaniose cutânea.

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 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*. Pacientes que tiveram ao menos um dos testes anteriores reagentes, foram incluídos no grupo com leishmaniose cutânea. Um grupo controle de pacientes com lesão sem diagnóstico de leishmaniose foi formado (não reagentes para ambos os testes mencionados anteriormente). Os pacientes foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Quantificação de MMP-9 ELISA: A concentração de MMP-9 no soro de pacientes foi determinada pela técnica de ELISA. Foi utilizado o kit Pro-MMP-9 ELISA Mouse, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os resultados foram expressos em µg/ml.

Análise estatística: Os dados foram plotados na planilha de excel e o desvio padrão e a média foram calculados. A análise estatística foi realizada através do programa Past 4.03 (em inglês, PAleontological STatistics). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

Resultados e Discussão

A MMP 9 pode estar associada à patogênese da leishmaniose cutânea podendo ser utilizada como um biomarcador da mesma (CAMPOS et al., 2012; 2014). Diante

disso, foi avaliado a concentração de MMP 9 nas amostras de pacientes controle e pacientes com leishmaniose cutânea. Foram analisadas 30 amostras, sendo 15 de cada grupo. Os grupos foram pareados quanto a idade, sendo $55,8 \pm 19,1$ e $50,9 \pm 12,8$ anos para o grupo controle e grupo com leishmaniose cutânea, respectivamente. Demais dados epidemiológicos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características como sexo, idade e tempo de lesão nos grupos estudados

	Grupo controle (n=15)	Grupo com leishmaniose cutânea (n=15)
Sexo		
Feminino	6	1
Masculino	9	16
Idade	$55,8 \pm 19,1$	$50,9 \pm 12,8$
Tempo de lesão	14 dias - 18 meses	21 dias - 12 meses

A concentração de MMP-9 no soro de pacientes com leishmaniose cutânea foi quase o dobro da encontrada no grupo controle, sendo $235,82 \pm 117,12$ e $132,71 \pm 88,46$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente ($p=0,016$) (Figura 1).

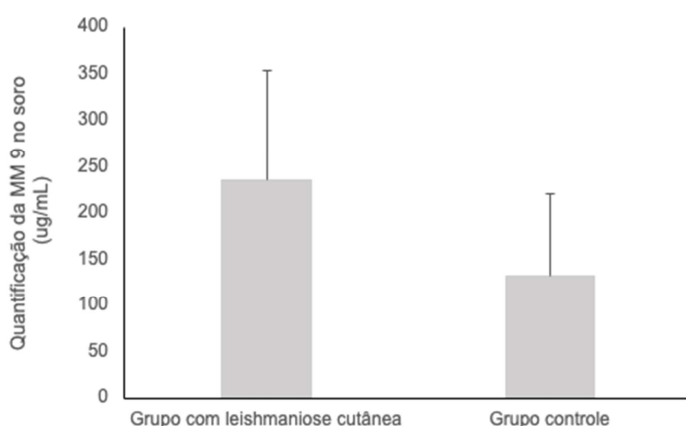


Figura 1 – Quantificação da metaloproteinase 9 (MMP-9) no soro de pacientes diagnosticados com leishmanioses (grupo com leishmaniose cutânea) em comparação à pacientes que apresentavam outros tipos de lesões (grupo controle). As barras representam o desvio padrão.

A maior concentração de MMP 9 no soro de pacientes com leishmaniose cutânea corroboram para o envolvimento da mesma com a patogênese da doença. Esta maior concentração pode tanto estar associada com o surgimento das lesões ulcerativas devido a degradação da matriz celular (CAMPOS et al. ,2014), quanto com a erradicação da doença devido ao recrutamento de células do sistema imune

que é facilitado pela mesma degradação de matriz (CAMPOS et al., 2014). Visto que a MMP 9 está principalmente envolvida com lesões causada por parasitos *Leishmania* quando comparado com lesões de outras etiologias, estudos futuros são imprescindíveis para elucidar o papel da dessa metaloprotease na patogênese da leishmaniose cutânea

Conclusões

Os resultados mostram que pacientes com leishmaniose cutânea apresentam concentrações maiores de MMP 9 no soro do que pacientes com lesões de outras etiologias, sugerindo um envolvimento da MMP 9 com a patogênese das lesões causadas por *Leishmania*.

Agradecimentos

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

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, 2017. Disponível em: <shorturl.at/ISU38> . Acesso em: 20 ago. 2022.

CAMPOS, TMC. **Produção de metaloproteinase 9 por monócitos de pacientes com leishmaniose cutânea**. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

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 Neglected Tropical Disease**, v.8, n.11, 2014.

CONCEIÇÃO, JA. **O papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis***. 2015. 98f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015

LEBER, TM; BALKWILL, FR. Regulação da produção de monócitos MMP-9 por TNF- α e um fator solúvel derivado de tumor (MMP-9). **Jornal britânico do câncer**, 1998; v.78, n.6, p.724-732,1998.