

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES PROFIBRÓTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE SISTÊMICA: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES E NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS.

Anderson Rodrigues de Almeida¹; Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹Estudante do curso de Biomedicina-CCB-UFPE; E-mail: andersonr.almeida@hotmail.com

²Docente/Pesquisador do Depto. De Bioquímica-CCB-UFPE. E-mail: mgrpitta@gmail.com

Sumário: A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença multissistêmica caracterizada por vasculopatia, inflamação, e fibrose progressiva da pele e órgãos internos. Nos pacientes com ES há uma hiperativação dos fibroblastos responsável pelo desenvolvimento da fibrose e acúmulo de moléculas da matriz extracelular. O estudo teve por objetivo avaliar a expressão de genes envolvidos na fibrose (TGFB, CTGF, PDGF e GAL3) na pele e células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) dos pacientes com ES. A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real, e utilizou-se o gene 18S como controle. Para verificação de possíveis diferenças entre médias foi usado o teste de Mann-Whitney. Os genes TGF- β , CTGF e PDGF apresentaram expressão aumentada na pele de pacientes com ES em comparação com a pele de controles saudáveis, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Em PBMCS de três pacientes identificou-se expressão mais importante de GAL3. Esse estudo demonstrou um aumento na expressão dos genes avaliados na pele de pacientes com ES reforçando o papel na fisiopatologia da doença e uma potencial utilidade como biomarcadores. A GAL3 apresentou aumento nas amostras avaliadas, sugerindo um papel na fisiopatogênese da ES.

Palavras-chave: biomarcadores; esclerose sistêmica; expressão gênica; fibrose

INTRODUÇÃO

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo de etiologia multifatorial, com uma variada expressão clínica que resulta da interação de três eventos principais: desregulação imunológica, alteração vascular e fibrose. A fibrose é a principal característica da doença, e ocorre devido a um estado de hiperativação dos fibroblastos que leva à expressão alterada de diversos genes que determinam a produção exagerada de colágeno e outros componentes da matriz extracelular. (ZIMMERMANN et al., 2013). Entre as moléculas implicadas na patogênese da ES, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) é considerado o principal regulador da fibrogênese fisiológica e da fibrose patológica. É produzido por fibroblastos, células T, monócitos e plaquetas, e exerce sua função por meio da ligação com o seu receptor (TGF β R2). Essa ligação promove a expressão de genes como colágeno tipo I, fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e outros (ZIMMERMANN et al., 2013). Outro importante mediador é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que participa do processo fisiológico de cicatrização de tecidos, promovendo a quimioatração de neutrófilos e macrófagos e na quimiotaxia e proliferação de fibroblastos. Também atua promovendo a síntese de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, além de estimular a secreção de TGF- β , MCP-1 e IL-6 (TROJANOWSKA et al., 2008). O CTGF age como cofator, aumentando a resposta ao TGF- β , promovendo a quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e estimulando a síntese de colágeno e fibronectina (LEASK, 2003). Estudos mostram que os níveis de

mRNA expresso em lesões fibróticas de pacientes portadores da ES são aumentados quando comparados com regiões não fibróticas do mesmo paciente (SHI-WEN et al., 2000).

A Galectina-3 (Gal-3) é uma lectina expressa em uma grande variedade de tecidos e células, com vários efeitos, tanto biológicos quanto em processos patológicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a galectina-3 participa da fisiopatologia de doenças fibróticas, promovendo a ativação de miofibroblastos e a produção de matriz extracelular (DVOŘÁNKOVÁ et al., 2011). Foi descrito na literatura um importante papel da Gal-3 no desenvolvimento de fibrose pulmonar, e que o bloqueio do gene da Gal-3 inibe a ativação de miofibroblastos, diminui a expressão de pró-colágeno tipo I *in vivo* e *in vitro*, e reduz a fibrose hepática (KOCA et al., 2014).

O presente projeto teve como objetivo avaliar a expressão de genes profibróticos (TGFB, CTGF, PDGF e GAL3) nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) e biópsias de pele de pacientes portadores de Esclerose Sistêmica.

METODOLOGIA

Foram selecionados 14 pacientes do sexo feminino e masculino atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com diagnóstico de Esclerose Sistêmica segundo os critérios preliminares do *American College of Rheumatology*. O grupo controle foi constituído por voluntários saudáveis, sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências, escolhidos aleatoriamente no serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da UFPE.

As amostras (biópsias de pele e PBMC's) tiveram o RNA extraído pelo método do Trizol, em seguida o RNA foi quantificado e reverso transcrito com o Kit: *High-capacity cDNA Archive Kit 2X* (Applied Biosystems) e a quantificação do cDNA foi feita por PCR quantitativa, utilizando o método TaqMan (Applied Biosystems) no aparelho 7900 HT Fast real time PCR (Applied Biosystems). O gene 18S foi utilizado como o controle endógeno. A expressão relativa do RNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para avaliação dos genes: TGFB, CTGF, PDGF e GAL3.

A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita pelas médias e desvios padrão. Para verificação de possíveis diferenças entre média, foi usado o teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O Projeto foi submetido e aprovado no COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – Centro de Ciências da Saúde (registro nº 529/11), Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS

Na avaliação da expressão dos genes CTGF, TGFB e PDGF, foi observado aumento da expressão de todos os genes em pacientes com ES (n=14) quando comparados com controles saudáveis (n=5) porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 1). A expressão da GAL3 foi avaliada em biópsias de pele de quatro pacientes com ES. Nessa avaliação, foi possível observar que apenas dois pacientes apresentaram aumento considerável na expressão de GAL3. Novas biópsias serão realizadas para confirmação dos resultados.

Ademais, avaliou-se a expressão dos genes CTGF, TGFB, PDGF e GAL3 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) de três pacientes com ES por PCR em tempo real. Observou-se uma expressão maior do gene GAL3 comparado com os demais genes analisados (Figura 2). No entanto, novos ensaios devem ser realizados com n

amostral maior para confirmar os dados obtidos e adicionalmente comparar com a expressão dos controles.

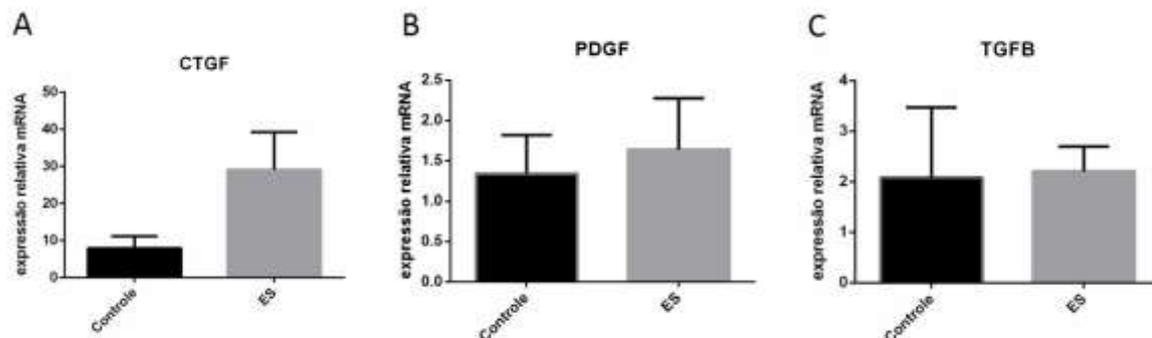


Figura 1. Expressão relativa dos genes CTGF (A), PDGF (B) e TGFB (C) em amostras de biópsias de pele de pacientes com ES (n=14) e controles saudáveis (n=5).

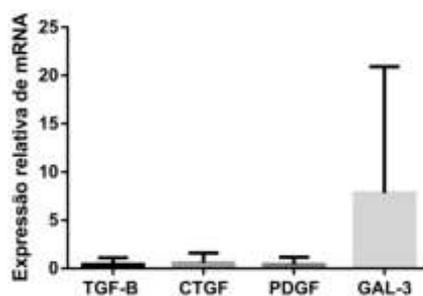


Figura 2. Expressão dos genes TGFB, CTGF, PDGF e GAL3 em PBMC's de pacientes com ES

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou expressão aumentada dos genes TGFB, PDGF e CTGF na pele dos pacientes com ES quando comparados aos controles, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significantes. Resultados semelhantes foram descritos em pacientes com ES em relação à expressão cutânea de TGFB (ZHOU et al, 2015), PDGF (TROJANOWSKA, 2008) e CTGF (IGARASHI et al, 1995). A expressão aumentada desses genes em um órgão caracteristicamente afetado pela doença reforça a participação dessas moléculas na fisiopatologia da doença. Estudos adicionais, com aumento do número de amostras, permitirão identificar mais claramente as diferenças entre pacientes e controles e a verificação de associações com manifestações clínicas.

Embora a ativação dos fibroblastos cutâneos seja considerada o evento-chave no desenvolvimento da fibrose cutânea, sabe-se que a infiltração da pele por linfócitos T ativados, plasmócitos e macrófagos precede a fibrose dérmica, ressaltando o papel desses elementos celulares na fisiopatologia da doença (ATAMAS et al, 2010). Foi detectada expressão de TGFB, CTGF e PDGF em PBMC's de pacientes com ES embora essas células não representem fontes importantes de produção dessas moléculas (BARAUT et al, 2010). Entretanto, chama a atenção a importante expressão de GAL3 detectada nesse pequeno grupo de pacientes.

Estudos prévios sugerem a participação da galectina-3 na fibrogênese fisiológica (DVOŘÁNKOVÁ et al., 2011) e níveis séricos elevados sugerem um papel na fisiopatologia da ES (KOCA et al., 2014). Entretanto, ainda não está estabelecida a importância da expressão local e sistêmica de GAL3 na ES. Nesse sentido, os resultados preliminares do presente estudo, que pela primeira vez demonstraram expressão de GAL3 na pele e em PBMC's de pacientes com ES, reforçam a necessidade de estudos adicionais para melhor compreensão do seu papel na doença.

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares sugerem expressão aumentada dos genes CTGF, PDGF, TGFB e GAL3 em amostras de pele e PBMC's de pacientes com ES, ressaltando o papel dessas moléculas na fisiopatologia da doença e sugerindo seu uso como biomarcadores. É necessária a realização de novas coletas de pacientes com ES para confirmação dos resultados, bem como a coleta de voluntários saudáveis para comparação da expressão com os portadores de ES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), ao INCT_if, a minha orientadora Prof^a.Dr^a Maira Pitta, a minha co-orientadora Andréa Dantas e a Prof^a.Dr^a Michelly Pereira.

REFERÊNCIAS

- ATAMAS, S.P. et al. Stimulation with type I collagen induces changes in gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis (scleroderma). **Clin Exp Immunol**, v. 161, n. 3, p. 426-435, 2010.
- BARAUT, J. et al. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 2, p. 65-73, 2010.
- DVOŘÁNKOVÁ, B. et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 6, p. 469-80, 2011.
- IGARASHI, A. et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. **J Invest Dermatol**, v. 105, n. 2, p. 280-284, 1995.
- KOCA, S.S. et al. Serum galectin-3 level in systemic sclerosis. **Clin Rheumatol**, v. 33, n. 2, p. 215-220, 2014.
- LEASK, A.; ABRAHAM, D.J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. **Biochem Cell Biol**, v. 81, n. 6, p. 355-63, 2003.
- SHI-WEN, X. et al. Autocrine Overexpression of CTGF Maintains Fibrosis: RDA Analysis of Fibrosis Genes in Systemic Sclerosis. **Experimental Cell Research**, v. 259, p. 213-224, 2000.
- TROJANOWSKA, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 47, sup. 5, p. v2-v4, 2008.
- ZHOU, Y. et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. **Hum Immunol**, v. 76, n. 1, p. 22-29, 2015.
- ZIMMERMANN, A.F.; PIZZICHINI, M.M. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. **Rev Bras Reumatol**, v. 53, n. 6, p.516-524, 2013.



XXIII CONIC
VII CONITI
IV ENIC