

Avaliação da bioenergética e conteúdo de heme de diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi* de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da doença de Chagas

Palavras-Chave: DTU, benznidazol, heme

Autores/as:

Vitória Rodrigues Inácio [FCF]

Profa Dra Fernanda Ramos Gadelha (orientador/a) [IB]

INTRODUÇÃO

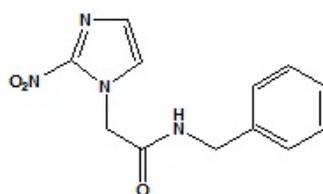
A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana foi descoberta por Carlos Chagas, em 1909, no interior de Minas Gerais. A DC é uma doença de caráter endêmico, acometendo 6 milhões de pessoas em 21 países da América Latina¹, com uma evolução crônica². A DC possui como agente etiológico um protozoário flagelado da família Trypanosomidae, o *Trypanosoma cruzi*, transmitido por vetores hemípteros hematófagos dos gêneros Triatoma, Rhodnius e Panstrongylus³. É classificada como uma doença negligenciada, havendo pouco investimento em pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes para o tratamento⁴.

A DC possui duas fases, a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda o paciente apresenta poucos sintomas e pode ser confundida com outras doenças como, por exemplo, uma infecção viral. Após a fase aguda, a maioria dos pacientes evolui para a fase crônica caracterizada por uma infecção assintomática e por baixa parasitemia⁵. A fase crônica possui quatro formas clínicas: a indeterminada, a cardíaca, a digestiva e a forma cardio-digestiva². Curiosamente, a prevalência das formas clínicas e a gravidade das manifestações variam de acordo com a região geográfica⁶.

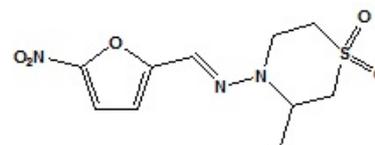
Entre o final da década de 1960 e início da década de 1970, houve a descoberta de duas drogas para o tratamento da DC, nifurtimox (NFX) e benznidazol (BZN)⁷. O BZN é o medicamento de escolha uma vez que apresenta melhor tolerabilidade, maior penetração nos tecidos, maior eficácia e segurança quando comparado ao NFX, utilizado apenas como alternativa em casos de intolerância ao BZN⁸. O BZN apesar de apresentar uma alta porcentagem de cura na fase aguda da doença, apresenta muitas reações adversas. Cerca de 50% dos pacientes apresentam algum efeito colateral

e, por conta disso, muitos não aderem ao tratamento. Até o momento não há tratamento efetivo e a terapia farmacológica não é satisfatória na fase crônica da doença⁹, uma vez que o fármaco tem baixa penetração tecidual, e como o parasita, nessa fase, está dentro da célula, o fármaco não consegue atingi-lo¹⁰.

As informações e o conhecimento sobre o parasita, sua diversidade genética e molecular avançaram com o tempo, mas, ainda assim, muitas questões continuam sem respostas¹¹. Um fator que complica ainda mais a descoberta de um tratamento mais eficaz e portanto menos tóxico para o hospedeiro vertebrado é a alta heterogeneidade genética existente entre as cepas de *T. cruzi*. Ao longo dos anos, buscou-se uma maneira mais abrangente para classificar a população desse parasita¹². A classificação mais atual é por Unidades Discretas de Tipagem (DTU) – que tem como conceito o conjunto de populações que são geneticamente semelhantes e podem



(a) Benznidazole



(b) Nifurtimox

ser identificadas por marcadores genéticos, imunológicos e moleculares em comum. O *T. cruzi* foi então classificado em sete DTUs (TcI - TcVI e TcBat)¹³.

O *T. cruzi* necessita de vários nutrientes e cofatores para o seu desenvolvimento, entre eles está o heme, uma metaloporfirina de ferro envolvida em várias reações biológicas e que serve como grupo prostético para várias proteínas com funções celulares importantes¹⁴. Assim como outros tripanossomatídeos, o *T. cruzi* não possui uma via completa para a síntese do heme, ou seja, precisa captar do hospedeiro¹⁵, e isso é muito importante para a sua replicação e sobrevivência. Essa metaloporfirina é essencial à biossíntese de várias proteínas como citocromos e complexos respiratórios, bem como enzimas relacionadas à biossíntese de esteróis e ácidos graxos insaturados. Interessantemente, a absorção de heme só ocorre nas formas replicativas, amastigotas e epimastigotas¹⁶. Recentemente foi identificada e caracterizada uma proteína no *T. cruzi* (TcHTE) responsável pela captação do heme nesses parasitas. Essa proteína está localizada na região do bolso flagelar que é a região onde ocorre transporte de nutrientes nos tripanossomatídeos¹⁶.

O objetivo inicial do projeto era analisar parâmetros bioenergéticos e o conteúdo de heme de oito isolados de *T. cruzi* (dois de cada forma clínica) de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da DC, cultivados em meios de cultura com concentrações distintas de hemina. Porém, devido a pandemia da Covid-19, tivemos que mudar o objetivo. Resolvemos, então, fazer uma pesquisa sobre as DTUs, qual a relação delas com as formas clínicas e com o BNZ. Em paralelo, pesquisamos a importância do heme para o parasita verificando se há alguma relação entre as formas clínicas, requerimento do heme e DTU do parasita.

METODOLOGIA:

Para a elaboração do presente trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico em artigos, buscando compreender melhor sobre a diferença entre as DTUs e como elas se relacionam com as formas clínicas da DC, bem como com o vetor e o hospedeiro não mamífero e se há alguma correlação com a resistência ou sensibilidade ao BNZ. Para isso, foram consultadas as bases de dados científicos contidos nas plataformas PubMed. Para tornar a busca mais específica foram utilizadas as palavras chaves: discrete typing and Trypanosoma cruzi; DTU and Trypanosoma cruzi; genetic diversity and trypanosoma cruzi; TcBat; chagas disease and DTU; chagas disease and discrete typing units; discrete typing units and Trypanosoma cruzi and benznidazole; DTU and Trypanosoma cruzi and benznidazole; genetic diversity and Trypanosoma cruzi and benznidazole; chagas disease and discrete typing units and benznidazole; Heme + t cruzi.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Realizamos um levantamento em bases de dados, como por exemplo: os periódicos da CAPES, SciELO, Medline, Acervo da Biblioteca de Manguinhos da FIOCRUZ e Pubmed. Como o Pubmed é uma base de dados que reúne a maior parte dos artigos científicos, mantivemos apenas essa base de dados como ferramenta. Utilizamos como parâmetros palavras chaves e o período de 2011 à 2021 e os resultados estão representados na Tabela 1.

Essa Tabela foi organizada relacionando cada DTU com a forma clínica da DC em humanos, a relação de cada DTU com vetores e mamíferos não humanos e a localização geográfica desses achados. É possível observar que a DTU TcI é a mais predominante (1672 casos), sendo encontrada também em mamíferos não humanos e em um número grande de vetores. Além disso, é a que possui a maior distribuição geográfica, abrangendo 15 países¹¹. Com esses parâmetros de busca, não foi encontrado nenhum dado correlacionando as DTUs nas formas digestivas e cardiodigestivas. A DTU TcBat foi encontrada em mamífero não humano, no Brasil, e o primeiro caso em humanos foi relatado em uma criança de 5 anos na Colômbia¹⁷.

Com relação a fase aguda, encontrou-se uma correlação em 109 casos, sendo 80 da DTU TcI, 28 da TcIV e 1 com infecção mista, ou seja, apresentava mais de uma DTU. A forma indeterminada é a mais prevalente, com 286 casos, sendo que 36% é da DTU TcI. Foram encontrados 94 casos da forma cardíaca, distribuídos entre as DTUs TcI, II, V, VI e mistas, sendo essa última a mais prevalente nessa forma clínica com mais de 50% dos casos.

Um estudo realizado por Brenière e colaboradores¹⁸, com seis mil cepas de *T. cruzi*, mostrou que um aspecto que chama a atenção para os isolados de TcI é essa distribuição geográfica diferencial prevalentes em pacientes da América do Norte (México e Estados Unidos), da América Central e norte da América do Sul (Colômbia e

Venezuela). Em outros países da América do Sul, é relatada uma maior heterogeneidade de DTUs humanos. No Peru, Bolívia e norte do Chile, a maioria dos pacientes está infectada com TcV, enquanto TcI e TcII humanos são abundantes no Chile. No centro e leste do Brasil, o TcII é prevalente, enquanto o TcI e o TcIV são detectados nos casos agudos da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Na Argentina, as cepas de TcV e TcVI prevalecem e no Paraguai, na fronteira com a Bolívia, Brasil e Argentina, TcII e TcV são os isolados humanos relatados¹⁸.

Tabela I - Distribuição das DTUs entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas e entre os Países

DTUs*	Humans Clinical forms				Vetor	Mammals not human	Geographical distribution	Reference
	Acute phase	Chronic phase						
		Indet.**	Cardiac	Digestive				
I	80	103	6		1672	201	American continent****	1, 2, 5, 6, 7 - 9, 11 - 14, 16, 18 - 34, 36
II		85	2		111	31	Brazil, Chile, Colombia Peru	4, 5, 7 - 9, 11, 15, 20, 24, 26
III		2			35	15	Bolivia, Brazil, Colombia, Peru, Venezuela	7, 8, 11, 14, 18, 20, 24
IV	28	1			392	261	Belize, Brazil, Colombia, Mexico, Peru, USA, Venezuela	6, 7, 10, 11, 16, 18, 20, 23, 24, 26, 30, 31, 33, 35, 36
V		29	26		46	11	Argentina, Brazil, Chile, Colombia Spain	4, 5, 15, 17, 20, 24, 28
VI		18	10		65	12	Argentina, Brazil, Chile, Spain	4, 5, 9, 15, 17, 20, 28
Mixed	1	48	50		125	6	Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Panama, Spain, USA	3, 4, 6, 8, 13, 15, 17, 21, 24, 25, 28, 30, 31, 33, 35
Tc Bat		1				1	Brazil, Colombia	20, 37

*Discrete Typing Units ou Unidade Discreta de Tipagem; **Indeterminada; ***Cardiodigestiva; ****Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Estados Unidos da América e Venezuela

E toda essa diversidade genética sugere que a susceptibilidade *in vivo* do *T. cruzi* aos medicamentos disponíveis e experimentais não depende só da suscetibilidade das pessoas infectantes, mas provavelmente também de sua virulência e histotropismo, bem como das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do composto¹⁹. Um estudo feito em camundongos, com a DTU TcVI, mostrou que a cura parasitológica induzida pelo tratamento, avaliada após a imunossupressão, foi de 41% e 35% para o tratamento com BZ e NFX, respectivamente, sugerindo uma resposta parcial a essas drogas na eliminação da carga parasitária²⁰.

Vela et al. mostrou que, apesar da alta heterogeneidade obtida nos resultados, a susceptibilidade ao BNZ *in vitro* difere entre as cepas de *T. cruzi*. Embora as diferenças intra-cepas não sejam constantes em todos os estágios

do ciclo de vida do parasita, e não possam ser generalizadas para todas as DTUs, a variação encontrada pelo grupo é instigante. É preciso que sejam feitos mais testes sob condições que permitam comparações imparciais entre DTUs e que sejam incluídos nesses testes uma variedade maior de cepas²¹. Também não há dados consistentes para apoiar qualquer correlação entre DTU e morbidade, risco de reativação ou transmissão congênita em humanos²². Um outro estudo, feito com as DTUs TcI, TcII e TcIV, comparou grupo tratado com BZN e grupo não tratado, durante a fase aguda. Nesse estudo foi mostrado que a taxa geral de eliminação da parasitemia foi de 53,6%, mas que isso pode variar de acordo com a DTU e a fase da infecção²³.

Um outro ponto interessante sobre esse parasita é a proteína TcHTE (*T. cruzi* heme transport enhancer ou Potenciador de transporte de heme *T. cruzi*), que desempenha um papel crítico no transporte de heme e é encontrada nas formas replicativas, amastigota e epimastigota¹³. Essa proteína é regulada pelos níveis de heme do meio²⁴. A captação de heme não ocorre em tripomastigotas em estágio infeccioso não replicativo²⁵.

O mRNA de TcHTE e os níveis de proteína diminuem em resposta a aumentos na concentração de heme. Usando diferentes análogos de heme fluorescentes, Pagura e colaboradores²⁴, demonstraram que os epimastigotas detectam a concentração intracelular de heme e, conseqüentemente, modulam a quantidade de TcHTE. Além disso, a expressão de TcHTE recombinante aumenta a replicação de amastigotas intracelulares, provavelmente por aumentar a captação de heme do citoplasma da célula infectada, onde sua disponibilidade pode ser um fator limitante de crescimento. Em resumo, mostraram que a atividade de transporte do heme em *T. cruzi* é fortemente modulada pela presença ou ausência de TcHTE²⁵.

CONCLUSÕES:

A população de *T. cruzi* é dividida em sete DTU (TcI – TcVI e Tcbat), que estão localizadas por todo o continente Americano., sendo a DTU TcI a mais prevalente. Essa diversidade genética sugere que a susceptibilidade do parasita aos medicamentos disponíveis não depende só das características do hospedeiro, mas provavelmente também da virulência e histotropismo do parasita. Estudos mostraram que determinadas cepas sejam mais susceptíveis ao medicamento de escolha, o BNZ, do que outras, mas é preciso que mais estudos sejam feitos para entender o porquê isso ocorre. Um dos requisitos desse parasita para a sua sobrevivência é a captação do heme para a sua sobrevivência. Essa proteína é captada do meio através de uma proteína transportadora TcHTE. Essa proteína transportadora é encontrada principalmente na forma epimastigota e sua concentração é regulada através da concentração de heme do meio. Não foi encontrado nenhum dado se há diferença no requerimento de heme nas DTUs.

BIBLIOGRAFIA

1. **Doença de Chagas.** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acessado em 17/08/2021
2. PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA I. **Chagas disease.** Lancet. 2018 Jan 6;391(10115):82-94.
3. LENT, H. **Evolução dos Conhecimentos sobre Vetores da Doença de Chagas 90 Anos após sua Descoberta.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: p. 89-92, 1999
4. WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. **Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil.** Ciência & Saúde Coletiva, p. 39-62. 2011.
5. RIBEIRO, A. **Transmissão sexual do Trypanosoma cruzi em camundongos chagásicos crônicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)—Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
6. ZINGALES, B.; et al. **The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** Volume 12, Issue 2, March 2012, Pages 240-253
7. CASTRO, J. A.; et al. **Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis).** Vol 25, Issue 8, 2006
8. DIAS, J. C. P.; et al. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.** CONSENSO • Epidemiol. Serv. Saúde 25 (spe) • Jun 2016

9. ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. **Nanotechnological approaches against Chagas disease**. Volume 62, Issues 4–5, 18 March 2010, Pages 576-588
10. URBINA, J. A. S. **Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches**. Volume 115, Issues 1–2, July–August 2010, Pages 55-68
11. ZINGALES, B. ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity**. Volume 184, August 2018, Pages 38-52
12. ZINGALES, B.; et al. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (7) • Nov 2009
13. JANSEN, A. M.; et al. **Distribuição das DTUs de *Trypanosoma cruzi* na natureza**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ecologia/biogeografia/>>. Acessado em: 17/08/2021
14. TRIPODI, K. E. J., BRAVO, S. M. M., CRICCO, J. A.; **Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways**. Enzyme Research. Volume 2011
15. KOŘENÝ, L., OBORNÍK, M., LUKEŠ, J. **Make It, Take It, or Leave It: Heme Metabolism of Parasites**. PLOS Pathogen. January 2013 | Volume 9 | Issue 1 | e1003088
16. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. 2019 Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf>. Acessado em: 19/08/2021
17. RAMÍREZ, J. D., et al. **First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype**. Zoonoses and Public Health, 2014, 61, 477–479
18. BRENIÈRE, S. F., WALECKX, E., BARNABÉ, C. **Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory**. PLoS Negl Trop Dis 10(8): e0004792, 2016.
19. REVOLLO, S., et al. **In Vitro Benznidazole and Nifurtimox Susceptibility Profile of *Trypanosoma cruzi* Strains Belonging to Discrete Typing Units TcI, TcII, and TcV**. *Pathogens* 2019, 8(4), 197
20. GULIN, J. E. N., et al. **Molecular and biological characterization of a highly pathogenic *Trypanosoma cruzi* strain isolated from a patient with congenital infection**. Experimental Parasitology Volume 186, March 2018, Pages 50-58
21. ZINGALES, B., et al. **Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109 (06) • Sept 2014
22. VELA, A., et al. ***In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis**. PLoS Negl Trop Dis 15(3): e0009269
23. GRUENDLING, A. P., et al. **Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV**. Am J Trop Med Hyg. 2015 Jun 3; 92(6): 1178–1189.
24. PAGURA, L. et al. **A new model for *Trypanosoma cruzi* heme homeostasis depends on modulation of TcHTE protein expression**. Microbiology | Volume 295, ISSUE 38, P13202-13212, September 2020
25. MERLI, M. L., et al. **The *Trypanosoma cruzi* Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake**. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan; 10(1): e0004359

Referências Tabela 1:

<https://drive.google.com/file/d/1TSMwfe6qOKJhRhs8aggckIF71v-D3kid/view?usp=sharing>