



Avaliação da importância do grupo heme para isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de pacientes portadores da doença de Chagas

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, Heme, Espécies reativas de oxigênio, bionérgica mitocondrial

Autores(as):

Bruna Eduarda Siqueira da Silva, FCF –UNICAMP

Prof^a. Dr^a.Fernanda Ramos Gadelha (orientadora), IB -UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A doença de Chagas (DC) é uma parasitose originada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo classificada com uma doença tropical negligenciada, pois acomete prevalentemente a população precária dos países subdesenvolvidos da América Latina [1]. Dentre as vias de transmissão, a via mais frequente, desde a última década, é a transmissão oral, através da ingestão de alimentos contaminados com as fezes do vetor (*Triatoma infestans*) ou com o vetor infectado [2]. A disseminação da parasitose também pode ocorrer por transmissão vetorial, transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou pela via acidental, que está mais direcionada a incidentes executados em laboratórios [1, 3].

O *T. cruzi* não sintetiza o grupo heme obtendo esta molécula do meio em que se encontra [4]. O heme é um grupo prostético de uma proteína e no parasita, entre outras funções, faz parte de proteínas que mediam a transferências de elétrons pelos complexos II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial.

O presente trabalho analisou como diferentes isolados obtidos de pacientes portadores da DC, se comportam frente à diferentes concentrações de hemina adicionada ao meio de cultura, sendo classificados como meio A (20µg de hemina), meio B (10µg de hemina) e meio C (sem adição de hemina). Deste modo, após adaptação dos parasitas por 3 repiques, foram analisados: Curva de proliferação; a produção de peróxido de hidrogênio, de superóxido mitocondrial e o consumo de oxigênio.

METODOLOGIA:

1. Cultura de células e adaptação dos parasitas aos meios de cultura com concentrações diferenciadas de hemina: *T. cruzi* epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ /ml) foram crescidos à 28°C em meio LIT

completo (68,45 mM NaCl, 5,36 m MKCl, 11 mM Glicose, 56,35 mM Na₂HPO₄, 5 mM Triptose, 5 mM Infusão de fígado, 10% soro fetal bovino, sem adição de hemina (Meio C) ou adição de 10 e 20 µg/mL de hemina (Meio B e A, respectivamente)). A adaptação ocorreu por três repiques, sendo sempre no início da fase estacionária de proliferação, respeitando a particularidade de cada tipo de isolado. Os isolados de *T. cruzi* foram obtidos de pacientes portadores da DC (CAAE: 42839615.0.0000.5404).

2. Curva de proliferação. 5,2 x 10⁶ céls/mL foram crescidas nos meios com diferentes concentrações de hemina (meio LIT A, B e C), à 28°C e a contagem dos parasitas foi feita utilizando-se uma câmara de Neubauer.

3. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio. 10⁷ céls/mL foram incubadas em PBS na presença de 5 mM succinato, 20 µM de digitonina, 1 U/mL de Horseradish peroxidase (HRP) e 25 µM de Amplex Red (Molecular Probes®) e a produção de H₂O₂ foi realizada em um Fluorímetro Hitachi, como descrito [6].

4. Determinação da produção de superóxido mitocondrial. 3 x 10⁸ céls/mL foram previamente incubadas com a sonda MitoSox(3,8-phenanthridinediamine,5-(60-triphenylphosphoniumhexyl)-5,6-dihydro-6-phenyl; Molecular Probes®) por 10 min e a produção de superóxido foi determinada em um Fluorímetro Hitachi, como descrito anteriormente [6].

5. Determinação do consumo de oxigênio. Foi realizado através de um Oxígrafo Hansatech acoplado a um eletrodo de Clark (Yellow Springs Instrumen Co). O consumo foi determinado utilizando-se substrato de Complexo II, conforme descrito anteriormente [6].

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A partir das curvas de proliferação (Figura 1), nota-se que os parasitas do isolado MFS demonstraram lidar melhor com uma quantidade intermediária de hemina no meio de cultura (meio B), chegando a 94% de proliferação a mais no último dia de contagem, do que o observado no meio A.

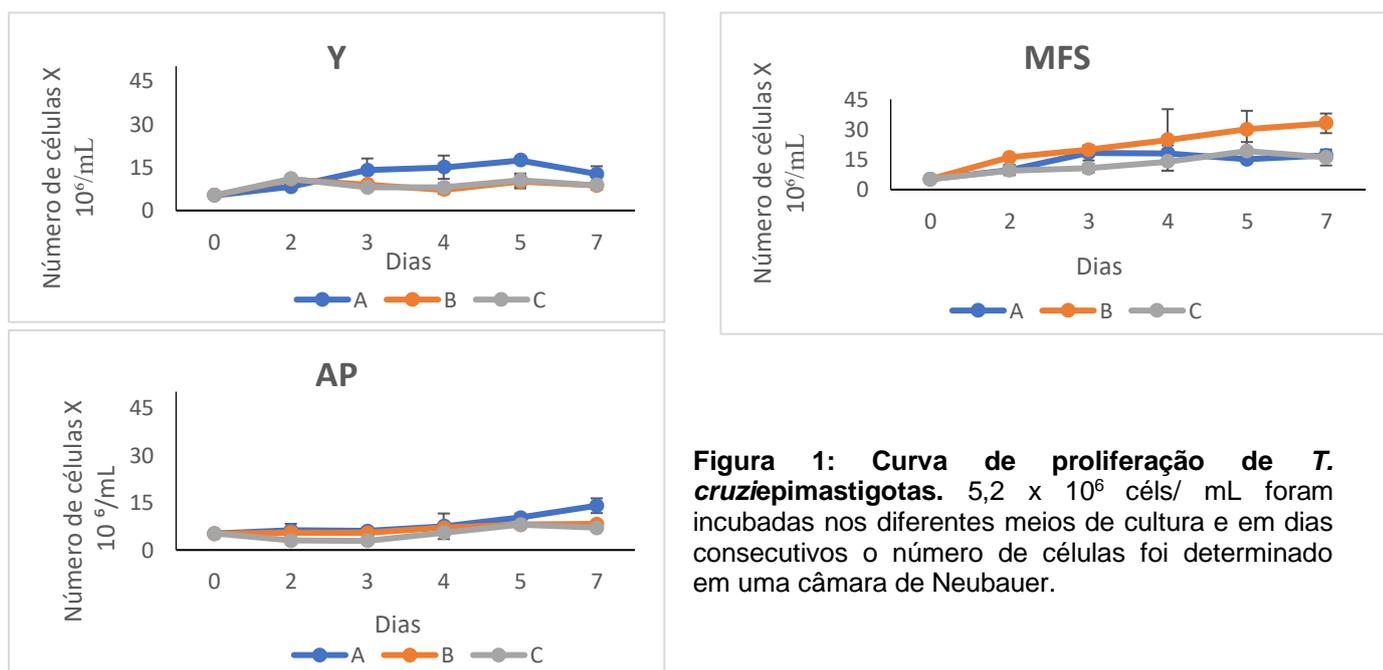


Figura 1: Curva de proliferação de *T. cruzi* epimastigotas. 5,2 x 10⁶ céls/ mL foram incubadas nos diferentes meios de cultura e em dias consecutivos o número de células foi determinado em uma câmara de Neubauer.

Divergindo deste isolado, a cepa Y (utilizada como referência para o estudo) apresentou maior proliferação no meio A e comportamento semelhante em meios B e C. Interessante que para o isolado AP, a diferença de proliferação das células crescidas em meios diferentes, só fica visível quando as células entram em fase estacionária, onde observa-se uma maior proliferação no meio A (Figura 1).

Em seguida, determinamos a produção de H₂O₂ pela cadeia respiratória mitocondrial (Figura 2). Observa-se que ao compararmos os parasitas dos isolados, com exceção do MFS, com os da cepa Y, houve sempre um aumento na produção de H₂O₂ na ausência ou presença de antimicina A (AA) quando adaptados em meio A (Figura 2). Com relação à Y, na ausência da AA, os parasitas dos isolados MJFL produziram 67% a mais H₂O₂ e parasitas AP produziram 200% a mais de H₂O₂. Por sua vez, na presença de AA, MJFL produziu 150%, MFS 25% a mais e AP 200% a mais que o observado em Y (Figura 2). Nota-se que os parasitas dos isolados MJFL e AP produziram maior quantidade de H₂O₂ do que os demais quando adaptado nos meios de cultura A e C, demonstrando que os isolados sofreram menor estresse oxidativo quando crescido em meio B.

Como os valores obtidos na adaptação dos parasitas no meio A, correspondem ao meio de cultura padronizado no laboratório, a maior produção de H₂O₂ de MJFL e AP poderia corresponder a uma menor expressão de peroxidases capazes de detoxificar essas espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas. Desta maneira, pode-se sugerir que MJFL e AP apresentam uma maior expressão da SOD, ou uma menor expressão da triparedoxina peroxidase mitocondrial. Devido a isto, decidimos preparar extratos proteicos para a determinação da expressão dessas enzimas por Western Blotting (próxima etapa).

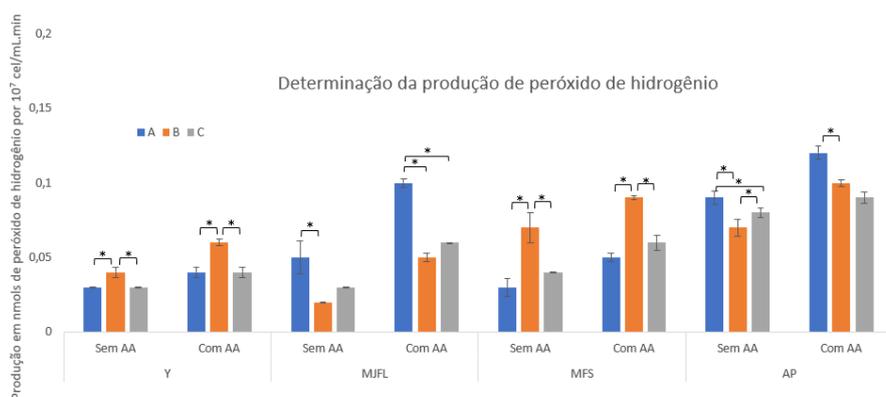


Figura 2: Produção de peróxido de hidrogênio de *T. cruzi* epimastigotas cepa Y e dos isolados MJFL, MFS e AP. 10⁷cel/mL foram utilizados no experimento após adaptação nos meios de cultura pela técnica do Amplex red. Análise estatística a partir do teste T de Student representada por (*).

Com relação a produção de superóxido mitocondrial, os resultados demonstraram que os parasitas da cepa Y crescidos nos diferentes meios apresentam uma produção semelhante em condições basais, mas na presença de AA, há uma menor produção nas céls adaptadas em meio A e C, quando comparada à produção no meio B (Figura 3). Para os parasitas MJFL a produção basal de superóxido é maior em meio B do que em meio A. Divergindo da cepa Y, os parasitas do isolado MJFL que foram adaptados em meio A e C tiveram uma produção muito mais baixa dessa EROs. Devido a produção de superóxido mitocondrial estar diretamente relacionada à maior ou menor expressão da

SOD, poderíamos propor que o isolado MJFL apresenta maior expressão de SOD mitocondrial quando comparada à Y, visto que a enzima é capaz de catalisar a dismutação do superóxido em H₂O₂. Esta hipótese dá suporte aos dados obtidos com a produção de H₂O₂ (Figura 2) e é baseada em dados obtidos com a avaliação da produção dessas EROs em epimastigotas da cepa Y e Tulahuen 2 [7].

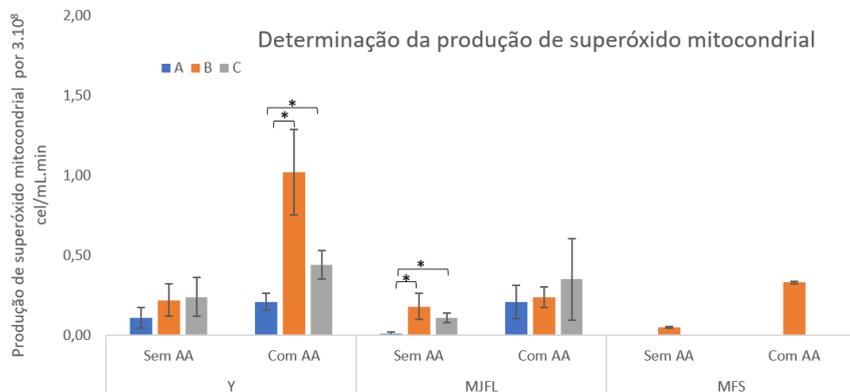


Figura 3: Produção de superóxido mitocondrial de *T. cruzi* epimastigotas cepa Y, dos isolados MJFL e MFS. 3.10⁸ cel/mL foram pré-incubados com Mitosox no dia do experimento, após adaptação nos meios de cultura com concentrações divergentes de hemina. Análise estatística a partir do teste T de Student representada por (*)

Em seguida, determinamos o consumo de oxigênio em células permeabilizadas ou não com digitonina, para avaliação da atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial (Figura 4). Nos experimentos em que as células não foram permeabilizadas, os parasitas em Y e MJFL tiveram maiores taxas de consumo de oxigênio em meio B, do que em A e C. Divergindo desta cepa, os parasitas dos isolados MFS e AP, tiveram as mesmas taxas de respiração quando crescidos em meio A e B. Com a adição do CCCP, um desacoplador da fosforilação oxidativa, há o aumento da velocidade da cadeia respiratória na maioria dos experimentos, demonstrando que as mesmas ainda não estavam em sua velocidade máxima.

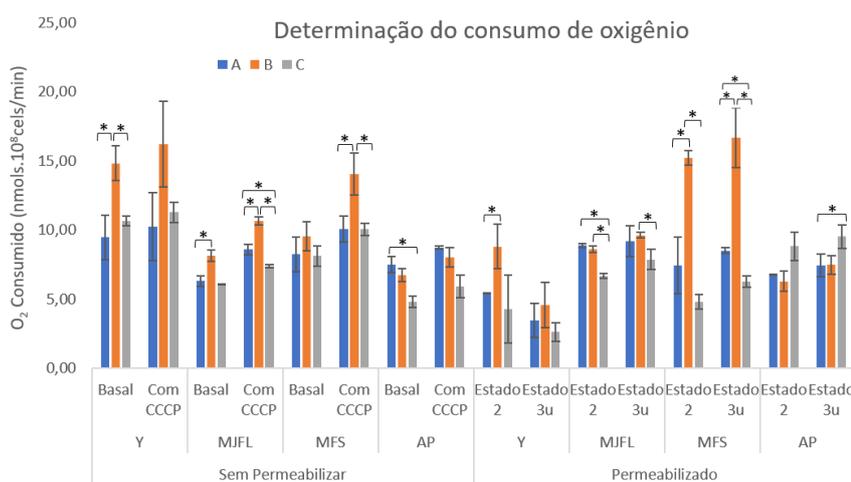


Figura 4: Determinação do consumo de oxigênio de *T. cruzi* epimastigotas da cepa Y, dos isolados MJFL, MFS e AP. Parasitas (10⁸ céls/ml) foram incubados em PBS e o consumo de oxigênio foi determinado em células não permeabilizadas com e sem CCCP e permeabilizadas (na presença de succinato, ADP, oligomicina e CCCP). O consumo de oxigênio determinado em um Oxígrafo. Análise estatística teste *t* p < 0,05 foi considerado significativo.

Quando o mesmo experimento foi realizado com células permeabilizadas, em Y houve uma diferença no consumo de oxigênio entre os meios A e B, contudo após adição de CCCP houve um consumo similar entre eles. As taxas de consumo dos parasitas do isolado MJFL não apresentaram

um aumento significativo após adição de CCCP em células crescidas em meio A e B. As taxas de consumo no isolado MFS foram mais acentuadas em meio B e bem menor em meio C. Parasitas do isolado AP tiveram consumo maior em C quando permeabilizadas, do que em meio A e B. Esses resultados estão de acordo com o descrito anteriormente pelo nosso grupo, onde o isolado AP apresentou um comportamento diferenciado com relação a bioenergética mitocondrial que os demais isolados [8].

CONCLUSÕES:

Os parasitas da cepa Y, por estarem mantidos em cultura há muito tempo, estão adaptados ao meio LIT (A) apresentando uma maior taxa de proliferação neste meio. Entretanto, os isolados obtidos de pacientes portadores da DC apresentaram um perfil diferenciado de proliferação quando cultivados em meios com diferentes concentrações de hemina. O comportamento desses isolados também foi diferenciado com relação a produção de H₂O₂ e superóxido e o consumo de Oxigênio pelo Complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, podendo-se sugerir que os isolados apresentam uma maior expressão da superóxido dismutase e/ou uma menor/menor expressão da triparedoxina peroxidase mitocondrial quando comparados aos parasitas da cepa Y. Esses resultados reforçam a heterogeneidade entre os isolados de *T. cruzi*, dando suporte a ideia que esta característica é o *calcanhar de Aquiles* para o desenvolvimento de uma terapia mais específica e, portanto menos tóxica para o tratamento da DC.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Integrating Neglected Tropical Diseases in Global Health and Development: Fourth WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Pereira et al, 2009. Chagas' Disease as a Food borne illness. doi: 10.4315/0362-028x-72.2.441.
3. Dias et al, 2011. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. doi.org/10.1590/S0037-86822011000r800011.
4. Tripodi et al, 2011. Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatids. doi: 10.4061/2011/873230.
5. Paes et al, 2011. The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. doi: 10.1155/2011/174614.
6. Silva et al, 2011. O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. doi: 10.1007/s10863-011-9369-0.
7. Peloso et al, 2012. Tryparedoxin peroxidases and superoxide dismutases expression. As well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. doi: 10.1016/j.abb.2012.02.020.
8. Nakamura et al, 2022. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes derived from trypomastigotes isolated from Brazilian chagasic patients. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100110.