



AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ISOLADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* OBTIDOS DE PACIENTES

Palavras-Chave: *TRYPANOSOMA CRUZI*, ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, MITOCÔNDRIA

Autores(as):

SOFIA PAOLA FERNANDEZ, FCF - UNICAMP

FERNANDA RAMOS GADELHA (orientador(a)), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC). A transmissão da doença pode ser vetorial, por transfusão sanguínea ou ainda oral. Atualmente no Brasil, estima-se que pelo menos 1 milhão de indivíduos estejam infectados [1]. A DC é uma doença negligenciada que tem um grande impacto no cenário epidemiológico, visto que é uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil [1]. Seu tratamento não é considerado ideal, pois o benznidazol não é efetivo na fase crônica da doença e apresenta efeitos colaterais graves [2] que muitas vezes dificultam a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, a população deste parasita é muito heterogênea, podendo ser considerada um *calcanhar de Aquiles* para o desenvolvimento de uma terapia mais específica para o tratamento da DC. Neste sentido, o estudo principalmente dos mecanismos de defesa antioxidante do parasita, é de extrema importância, tendo em vista a procura de alvos para o desenvolvimento de fármacos mais específicos e, portanto, menos tóxicos para o paciente.

OBJETIVOS:

Determinar a produção de peróxido de hidrogênio, superóxido e de NADPH pela via das pentoses fosfato e a EC₅₀ de 3 isolados de *T. cruzi* obtidos de pacientes portadores da DC (MJFL (a), AP (b) e MFS (d)) e a cepa Y (c), utilizada como padrão.

METODOLOGIA:

Cultura de *T. cruzi* (epimastigotas): *T. cruzi* epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ /ml) foram crescidos à 28°C em meio LIT completo (68,45 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 11 mM Glicose, 56,35 mM Na₂HPO₄, 5 mM Triptose, 5 mM Infusão de fígado, 10% soro fetal bovino). Para os experimentos, na fase estacionária, as células

foram coletadas por centrifugação (1000 x g, 5 min a 4°C) e ressuspensas em meio PBS, pH 7,2 e o número de células determinado por contagem em câmara de Neubauer [3]. Para o projeto obteve-se a aprovação pelo Comitê de ética (CAAE: 22598719.2.0000.5404).

Determinação da produção de peróxido de hidrogênio: 10^8 células/mL foram incubadas em PBS na presença de 5 mM succinato, 20 μ M de digitonina, 1 U/mL de Horseradish peroxidase (HRP) e 25 μ M de AmplexRed (Molecular Probes®). A fluorescência foi monitorizada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 nm e 587 nm, respectivamente, em um Fluorímetro Hitachi F2500 [4].

Determinação da produção de superóxido mitocondrial: 10^8 céls/mL foram carregadas com 5 μ M MitoSOX (3,8-phenanthridinediamine,5-(60-triphenylphosphoniumhexyl)-5,6-dihydro-6-phenyl; Molecular Probes®) [4] no tampão Krebs-Henseleit (KH, 15 mM NaCO₃, 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM NaH₂PO₄) à 28°C por 10 min. Os parasitas foram lavados e ressuspensos em tampão KH. O MitoSox oxidado pelo superóxido foi então detectado pela sua fluorescência em um Fluorímetro Hitachi F2500 nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 580 nm, respectivamente [4].

Determinação da produção de NADPH: 10^7 células/mL foram incubadas em tampão contendo 50mM Tris HCl pH 7,4, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,1% Triton e 13 μ M coquetel inibidor de protease (SIGMA). Para determinação adicionou-se 100 μ M 6-fosfogluconato (6PG), 100 μ M glicose 6-fosfato (G6P) e 250 μ M NADP⁺. Através de um Espectrofotômetro foram medidos os valores de absorbância do NADPH produzido (comprimento de onda de 340 nm) durante 10 minutos. Para os cálculos utilizou-se a lei de Lambert-Beer conforme descrito em [5].

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Estudo prévio do nosso grupo [6], demonstrou que estes isolados pertencem a DTU TcII, e apresentam características únicas, sugerindo que dentro do grupo TcII pode-se ter uma variação inter-grupo [6].

Dessa forma iniciamos os nossos estudos com a determinação da produção de superóxido mitocondrial, estando os resultados apresentados na Figura 1. Observa-se que há diferenças na quantidade de superóxido produzido pelos diferentes isolados. O isolado MJFL produz uma menor quantidade dessa espécie reativa de oxigênio (EROs), enquanto os demais isolados têm uma produção semelhante, inclusive a cepa utilizada como referência. Ao adicionarmos AA, um inibidor do Complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (CRM), verificamos o aumento desta produção em todas as células devido ao aumento do vazamento de elétrons pela CRM. Observamos também que a produção pelo MJFL se iguala ao do isolado AP, e os demais têm produções semelhantes, ou seja, nas células do isolado AP este aumento é menor na presença de AA do que nas células da MJFL.

Uma menor produção do superóxido pode estar relacionada com uma maior expressão da superóxido dismutase mitocondrial (SODB). Assim, os isolados AP, Y e MFS produziram maiores quantidades de superóxido, dessa maneira os três isolados podem ter uma menor expressão dessa enzima, quando comparados as células do isolado MJFL. Será analisada a expressão dessa enzima.

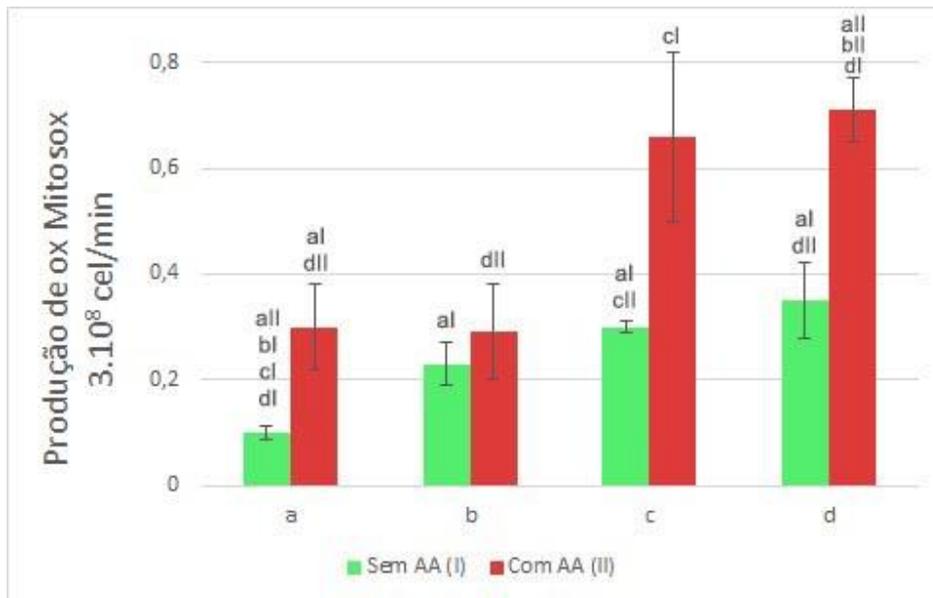


Figura 1: Produção de superóxido de hidrogênio oxidado por *T. cruzi* epimastigotas. 3.10^8 cels/mL previamente carregados com MitoSox, foram incubadas em PBS e a fluorescência do ox MitoSox foi determinada em um fluorímetro. Grupos na ausência (barras verdes) e presença (barras vermelhas) de antimicina A ($1 \mu\text{g/mL}$). Os isolados estão representados no gráfico por a (MJFL), b (AP), c (Y) e d (MFS). Análise estatística pelo teste t de Student.: $p < 0.05$ considerado significativo, para os grupos.

Em seguida analisamos, a produção de H_2O_2 (Figura 2). Esses resultados estão de acordo com os obtidos para os níveis de superóxido produzidos, uma vez que a MJFL tendo uma menor produção desta EROs, provavelmente apresenta uma maior expressão da SOD, que ao dismutar o H_2O_2 , leva a sua maior produção. O raciocínio inverso pode ser utilizado para os resultados obtidos com as outras células (Figura 2).

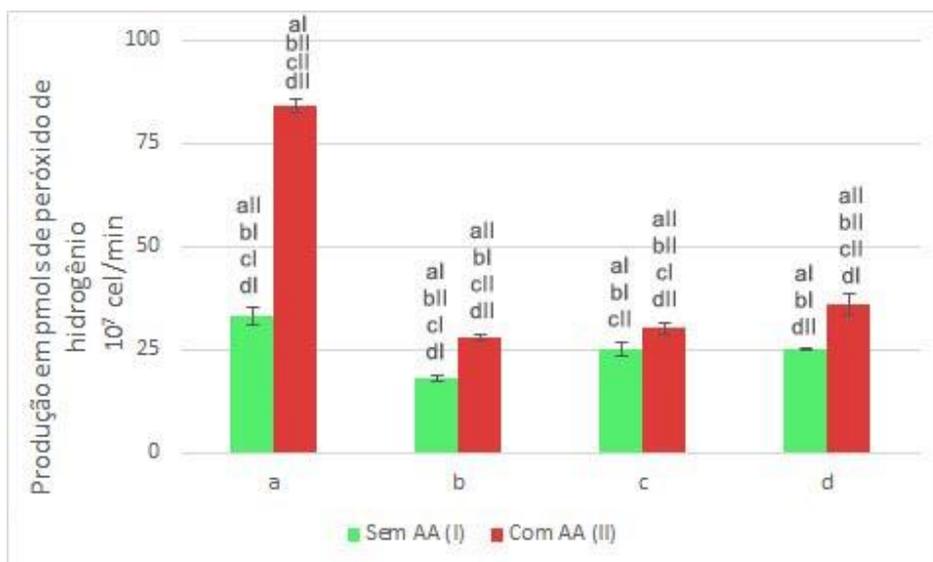


Figura 2: Produção de peróxido de hidrogênio por *T. cruzi* epimastigotas. A produção de H_2O_2 foi determinada em 10^7 cels/ml na ausência (barras verdes) e presença (barras vermelhas) de AA pela técnica do Amplex red. Os isolados estão representados no gráfico por a (MJFL), b (AP), c (Y) e d (MFS). Análise estatística pelo teste t de Student.: $p < 0.05$ considerado significativo, para os grupos.

Para neutralizar o peróxido de hidrogênio, o *T. cruzi* utiliza-se do NADPH como doador de elétrons para a tripanotona redutase que através das triparedoxinas, triparedoxinas peroxidases, mitocondrial e citosólica, e a glutatona peroxidase reduzem o H₂O₂ [7]. Neste sentido, determinamos os níveis desta co-enzima nas diferentes células estudadas.

Relacionando com a produção de H₂O₂ é possível observar que o isolado MJFL possui a menor produção de NADPH (Figura 3) e a maior de H₂O₂ (Figura 2). Essa produção elevada pode estar associada à uma menor expressão das triparedoxinas peroxidases, o que justifica os baixos níveis de NADPH detectados

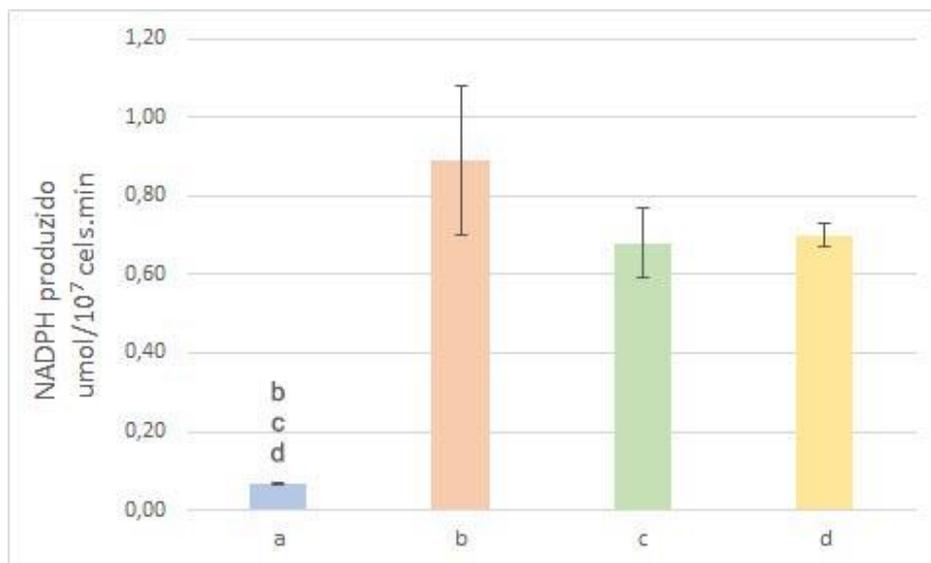


Figura 3: Produção de NADPH produzido pelos isolados de *T. cruzi*. A produção foi determinada pela dosagem enzimática das enzimas produtoras de NADPH da VPP. Os isolados estão representados no gráfico por a (MJFL), b (AP), c (Y) e d (MFS). Análise estatística pelo teste t de Student.: $p < 0,05$ considerado significativo, para os grupos.

Por outro lado, o isolado que produziu menor quantidade de peróxido foi o AP (Figura 2), tendo neutralizado mais efetivamente assim o H₂O₂ formado, o que pode estar relacionado com uma maior expressão de peroxidases. Dados publicados por nosso grupo de pesquisa com *T. cruzi* epimastigotas Y e Tulahuen 2 dão suporte a hipótese levantada [4].

CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos indicam que assim como os dados de bioenergética mitocondrial [6], que esses isolados de *T. cruzi*, mesmo sendo do mesmo grupo (TcII), apresentam diferenças significativas na produção de EROs e provavelmente na expressão das enzimas antioxidantes. Esses resultados ampliam a nossa visão sobre as defesas antioxidantes desses parasitas reforçando a heterogeneidade da população de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS:

- [1] Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022. Ministério da Saúde. Número especial. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022/view>> Acesso em: 07 Jul. 2023
- [2] de Castro, S. L; Soeiro, M.N.C. Portal da Doença de Chagas - Fiocruz. Drogas tripanossomicidas. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/doenca/tratamento/#>> Acesso em: 07 Jul. 2023
- [3] Castelani et al, 1967. Journal Protozoology.(1967) 14: 447-451.
- [4] Peloso EF et al, 2012 Arch Biochem Biophys. 520(2):117-22. doi: 10.1016/j.abb.2012.02.020.
- [5] Mielniczki-Pereira AA, et al, 2007. Acta Trop. 2007 Jan;101(1):54-60. doi: 10.1016/j.actatropica.2006.12.001. Epub 2006 Dec 16.PMID: 17214950
- [6] Nakamura et al, 2022 Curr Res Microb Sci 3:100110. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100110. eCollection 2022
- [7] Braga, S.F.P. 2012. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/EMCO-96DGE3>> Acesso em: 10 Jul. 2023