

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

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma Cruzi*-1, Heme-2, Bioenergética-3

**Bruna Eduarda Siqueira da Silva, FCF – UNICAMP**

**Ellen Vieira de Lima, Biomedicina - PUC**

**Sofia Paola Fernandez, FCF - UNICAMP**

**Vitor Klipel da Silva Bertolini, Biomedicina - PUC**

**Gabriela Silva Fuga, FCF - UNICAMP**

**Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel (co-orientador), IB- UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ramos Gadelha (orientadora), IB- UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

Endêmica em 21 países da América Latina e considerada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), a doença de Chagas (DC) é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que apresenta diferentes formas de transmissão [1,2]. O agente vetor da DC é um inseto hematófago que necessita dos componentes presentes no sangue dos mamíferos para sua sobrevivência, chegando a obter 10 mM de heme decorrente da quebra da hemoglobina, em apenas uma única refeição [3].

O heme é um grupo prostético constituído por quatro anéis pirrólicos, com um átomo de ferro em posição central [4]. No *T. cruzi*, o heme apresenta papéis cruciais para hemoproteínas envolvidas nas defesas antioxidantes, em reações redox, citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, heme peroxidases, entre outras funções [5-7]. Ainda, que o *T. cruzi* dependa essencialmente da atividade de hemoproteínas para o seu metabolismo, ele não possui a via biossintética parcial ou total do heme, sendo necessário que sua obtenção seja a partir do meio em que se encontra [4]. Portanto, 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/ml), meio B (10µg de hemina/ml) e meio C (sem adição de hemina). Deste modo, após adaptação dos parasitas por 3 repiques, foram analisados: Curva de proliferação; avaliação morfológica; determinação da concentração intracelular de heme; produção de NADPH e 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 (*Liver Infusion Tryptose*) A, B e C completo (68,45 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 11 mM Glicose, 56,35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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:** Foram realizadas dois tipos de curvas: 1) Sem pré-adaptação dos parasitas aos meios A, B e C 2) Com pré-adaptação em meio C.  $5,2 \times 10^6$  células/mL foram crescidas em vials nos meios de cultura LIT (A, B e C) à 28°C e em um volume máximo de em 500 µl, sendo a contagem dos parasitas realizada através de uma câmara de Neubauer.

**3. Análise quantitativa da mudança morfológica nas células adaptadas aos diferentes meios de cultura:** Após os 3 repiques de adaptação em meio C, foram realizadas de dois tipos de análise morfológica: 1) Epimastigotas em fase estacionária; 2) Epimastigotas com 12 dias de incubação. Foram examinados 100 epimastigotas para cada meio de cultura

(meio A; meio B e meio C) e isolado, por microscopia óptica (40×, EVOS XL Core). A morfologia do parasita foi classificada de acordo com as formas predominantes e a frequência de cada forma (%) foi calculada para cada cultura [8].

**4. Determinação do pool intracelular de heme:** *T. cruzi* epimastigotas ( $10^8$ /mL) foram ressuspensos em 1 mL de tampão Tris 1 mM pH 8.0. Realizou-se uma sonicação de 2 minutos, alternando entre 5 segundos no gelo e 5 segundos no sonicador. A essa amostra, adicionou-se 100  $\mu$ L de NaOH 1M, e em seguida ela foi agitada em vortex, e depois foram adicionados 200  $\mu$ L de piridina alcalina e vortexada novamente. Todo o conteúdo foi transferido para uma cubeta de quartzo. No espectrofotômetro, inicialmente utilizou-se água mili Q e, posteriormente, uma solução de piridina alcalina como leitura de referência do branco para 500 a 600 nm. Para a realização do experimento, utilizou-se a amostra e a adição de 2-3 mg de hidrossulfato de sódio, a cubeta foi homogeneizada e a absorbância lida entre 541 e 557 nm em triplicatas [9].

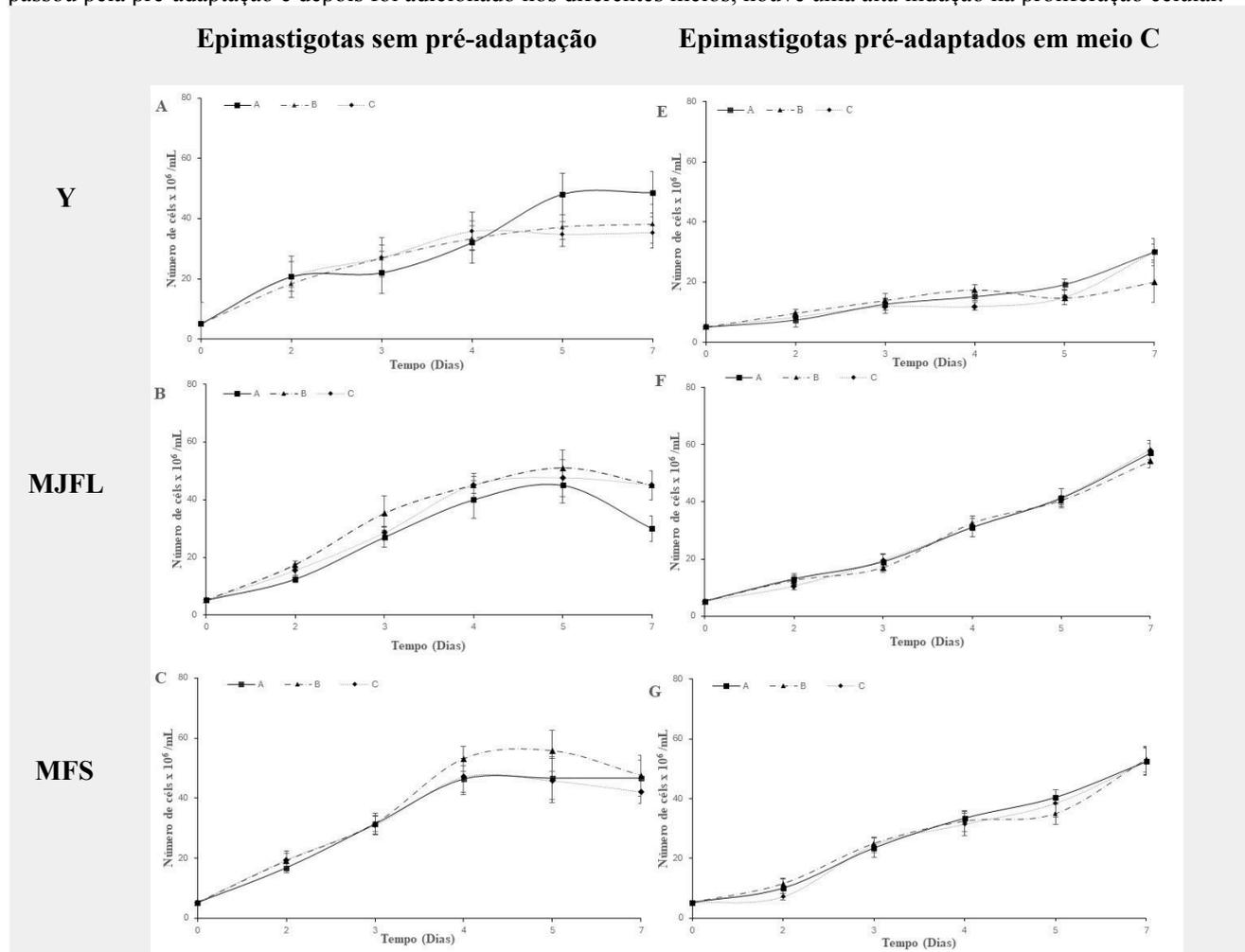
**5. Produção de NADPH pela via das pentoses fosfato:** Realizado com um coquetel inibidor de protease (Cocktail Set III, Calbiochem) e através de um espectrofotômetro [BECKMAN DU640], a produção de NADPH proveniente da via das pentoses fosfato foi determinada, conforme descrito anteriormente [10].

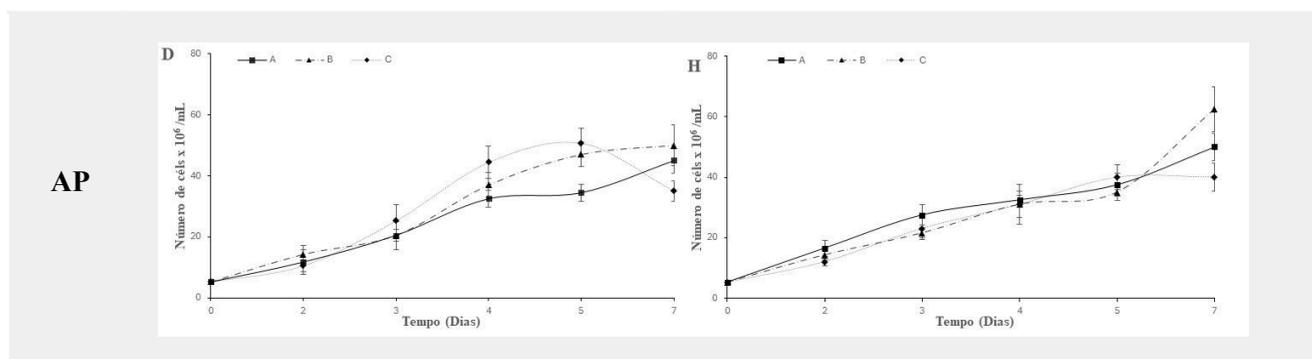
**6. Determinação do consumo de oxigênio:** Realizado através de um Oxígrafo Hansatech acoplado a um eletrodo de Clark (Yellow Springs Instrument Co). O consumo foi determinado utilizando-se substrato do Complexo II, conforme descrito anteriormente [11].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Ao analisarmos os parasitas da cepa Y (**Figura 1**), epimastigotas não pré-adaptados resultaram em um índice de proliferação (IP) maior em meio A, do que nos demais meios (**Tabela 1**). Padrão que foi parcialmente seguido quando os parasitas foram pré-adaptados em meio C. Realizamos a pré-adaptação no intuito de reduzir o pool intracelular de heme que pudesse estar armazenado no parasita. Deste modo, sob as novas condições, ambos os meios A e C induziram uma proliferação 33,3% maior do que em meio B. Diferentemente do observado por Lara *et al* [12], onde epimastigotas da cepa Y e Dm28c de *T. cruzi*, sofreram influência positiva do heme na proliferação, de maneira dose-dependente, quando cultivados em meio BHI (*Brain-Heart Infusion*).

Por sua vez, os isolados obtidos de pacientes humanos apresentaram um perfil diferenciado quando analisados. Epimastigotas não pré-adaptados do isolado MJFL, apresentaram 50,5% a mais de proliferação nos meios B e C, do que no meio A. Quando pré-adaptados, os três meios apresentaram gráficos com perfis bastante semelhantes, entretanto ao final do 7º dia, o meio C induziu 1,7% a mais de proliferação do que em meio A. Divergindo do ocorrido com Y, quando MJFL o passou pela pré-adaptação e depois foi adicionado nos diferentes meios, houve uma alta indução na proliferação celular.





**Figura 1: Curva de proliferação de *T. cruzi* epimastigotas.**  $5,2 \times 10^6$  céls/ml foram crescidos nos diferentes meios de cultura (meio A, meio B e meio C) e nas condições: 1) Sem pré-adação 2) Pré-adação em meio C. O número de células foi determinado em uma câmara de Neubauer pelos seguintes dias.

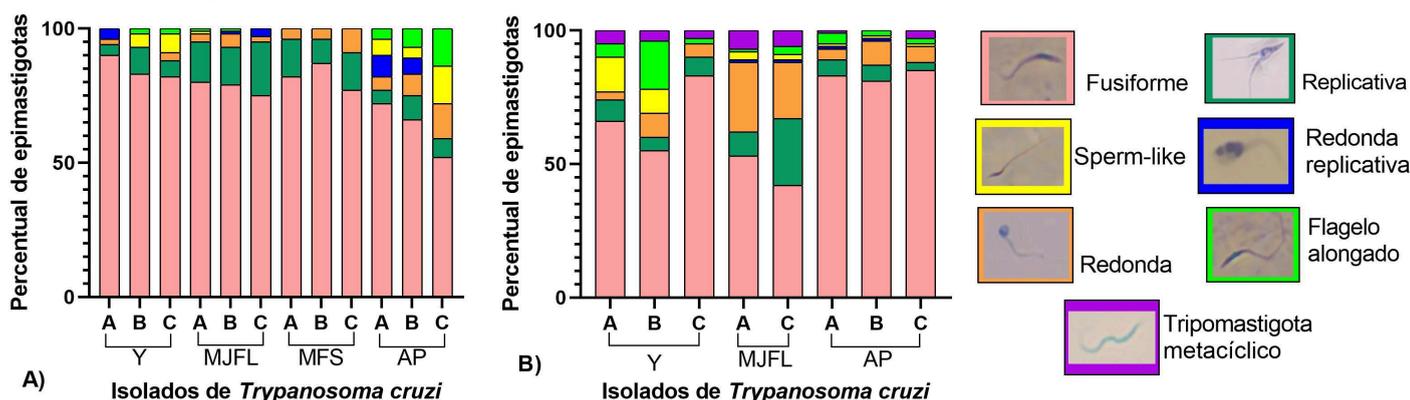
Isolados	Índice de proliferação celular de epimastigotas <i>T. cruzi</i>					
	Não pré-adação			Pré-adação em meio C		
	Meio A	Meio B	Meio C	Meio A	Meio B	Meio C
Y	9,36	7,35	6,8	5,77	3,85	5,77
MJFL	5,76	8,65	8,65	10,96	10,43	11,15
MFS	8,97	9,13	8,10	10,09	10,24	10,09
AP	8,65	9,61	6,73	9,61	12,02	7,69

**Tabela 1: Índice de proliferação celular de epimastigotas *T. cruzi*, não pré-adação e pré-adação em meio C, e posteriormente mantidos em meios com diferentes concentrações de hemina.** Para cada condição, o índice de proliferação foi calculado como o resultado da razão entre o número de parasitas ao final e ao início do experimento [13].

Para os isolados MFS e AP, o meio B demonstrou ser o que resulta maior proliferação celular tanto na ausência de pré-adação, quanto pré-adação. Sugerindo que para os isolados humanos, a quantidade do aporte de heme é distinta quando comparados aos epimastigotas da cepa Y. Assim como o isolado MJFL, os isolados MFS e AP também tiveram maior indução de proliferação após a pré-adação em meio C.

Em relação à análise morfológica, na **Figura 3-A** é possível observar a prevalência de 6 principais morfologias de epimastigotas em fase estacionária, sendo classificadas como: fusiforme; replicativa; redonda; *sperm-like*; redonda replicativa; e flagelo alongado. Epimastigotas da cepa Y e do isolado AP foram os que apresentaram maior variação morfológica. Divergindo dos isolados MJFL e MFS que apresentaram um perfil semelhante, tendo a prevalência das formas fusiforme e replicativa.

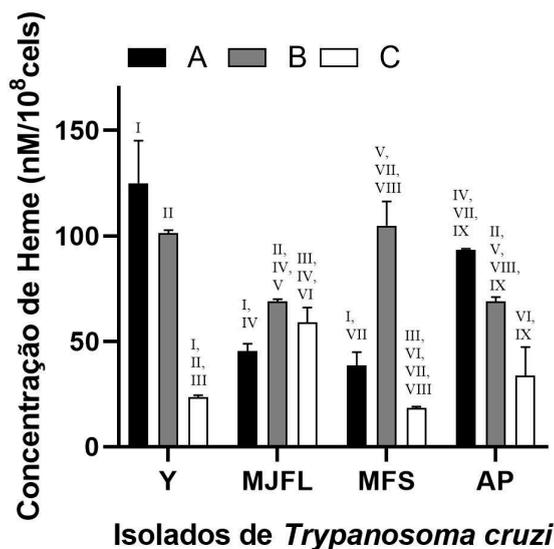
Na **Figura 3-B**, visamos avaliar se as diferentes concentrações do heme iriam interferir no processo de metaciclogênese do parasito. Na cepa Y, foi possível observar que apesar do meio C ter induzido menores variações morfológicas, o meio A promoveu o desenvolvimento de 5% de tripomastigotas metacíclicos, enquanto o meio B 4% e o meio C 3%. Por sua vez, no isolado MJFL, observamos 7% de tripomastigotas em meio A e 6% em meio C. Enquanto que em AP, houve um contraste com o que foi observado na fase estacionária (**Figura 3-A**), resultando em menores variações morfológicas e, respectivamente, 1% de tripomastigotas em meio A, 2% em meio B e 3% em meio C.



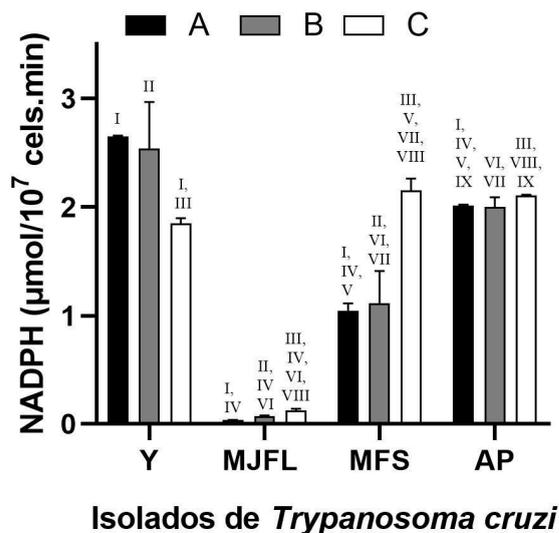
**Figura 3: Análise quantitativa da mudança morfológica nas células adaptadas aos diferentes meios de cultura.** A) Epimastigotas em fase estacionária; B) Epimastigotas com 12 dias de incubação. A análise ocorreu por microscopia óptica (40x, EVOS XL Core). A morfologia do parasita foi classificada de acordo com as formas predominantes: Fusiforme; Replicativa; Redonda; Flagelo alongado; *Sperm-like*; Redonda replicativa; e Tripomastigota metacíclico.

Como o heme é crucial para hemeproteínas envolvidas entre diversas funções [5-7], dosamos sua concentração intracelular nos epimastigotas adaptados às diferentes concentrações de hemina. Ao analisarmos a **Figura 4**, nota-se que a concentração de hemina nos epimastigotas da cepa Y e do isolado AP foram maiores no meio com A e, em ordem decrescente, nos meios B e C. Divergindo do observado para os isolados MJFL e MFS, os quais tiveram a maior concentração intracelular no meio com 10 µg/ml. Interessantemente, para os isolados MJFL a concentração de hemina ainda

era 30% maior em meio C do que quando pré-adaptados em 20 µg/ml de hemina, podendo sugerir que a concentração utilizada poderia estar sendo excessiva para esse isolado.



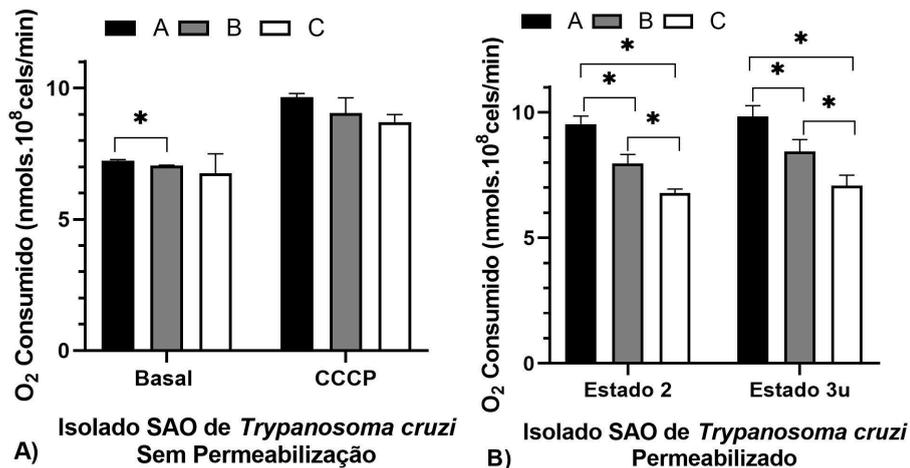
**Figura 4.** Dosagem de heme intracelular de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas da cepa referência Y e dos isolados MJFL, MFS e AP. A dosagem do heme intracelular foi determinada após pré-adaptação dos epimastigotas em meios de cultura com diferentes concentrações de hemina (0, 10 e 20 mg/L). Análise estatística pelo teste t de Student.:  $p < 0.05$  considerado significativo, para os grupos. Os dados significativos estão representados no gráfico por I - IX entre os isolados



**Figura 5:** Produção de NADPH pelos isolados de *T. cruzi* cultivados em meios com distintas concentrações de hemina. A produção foi determinada pela dosagem enzimática das enzimas produtoras de NADPH da VPP em meio A, B e C. Análise estatística pelo teste t de Student.:  $p < 0.05$  considerado significativo, para os grupos. Os dados significativos estão representados no gráfico por I - IX entre os isolados.

Além das propriedades mencionadas, o heme é uma molécula pró-oxidante [14] e cofator essencial para o funcionamento da enzima antioxidante e heme-dependente, ascorbato peroxidase [15]. O arsenal de defesa antioxidante do *T. cruzi*, é constituído por enzimas antioxidantes presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e nos glicossomas. Nestes locais, ocorrem reações sucessivas de oxirredução em um ciclo catalítico, as quais são dependentes de NADPH proveniente da via das pentoses fosfato [15]. Deste modo, ao avaliarmos a produção de NADPH na **Figura 5**, nota-se que parasitas da cepa Y que foram mantidos em meio C, tiveram uma redução de 30% na produção de NADPH quando comparados ao meio A. Epimastigotas do isolado MJFL tiveram baixíssimas produções de NADPH nos três diferentes meios. A maior produção de MJFL foi observada quando pré-adaptados no meio sem adição de hemina, correspondendo a uma produção 93% menor do que a observada na cepa Y, em meio C. Surpreendentemente, o isolado MFS demonstrou produzir 2X mais NADPH quando adaptado em meio C, do que quando com 20 µg/ml de hemina. Enquanto que no isolado AP, o meio A e B induziram a mesma produção de NADPH e o meio C 4% a mais que ambos.

Ainda que os isolados tenham sido genotipados e agrupados em TcII, a heterogeneidade destes epimastigotas faz com que seja possível observar comportamentos distintos para cada tipo específico [16]. Deste modo, na **Figura 6**, determinamos o consumo de oxigênio do isolado SAO nas condições sem permeabilização e permeabilizado. Sem permeabilização (**Figura 6-A**), os três meios demonstram resultar em um consumo de O<sub>2</sub> semelhante, mas que é 3% maior em meio A do que em meio B, sem CCCP. Em contrapartida, quando ocorreu a permeabilização (**Figura 6-B**), o consumo de oxigênio foi 16% maior no meio A, em relação ao meio B. Assim como observado por Vieira *et al* [17], onde realizaram a suplementação do meio BHI com 30µM de hemina, em epimastigotas CL Brener resultou em um maior consumo de O<sub>2</sub>.



**Figura 6:** Determinação do consumo de oxigênio de *T. cruzi* epimastigotas do isolado SAO. **A)** Epimastigotas não permeabilizados, sem CCCP e com CCCP; **B)** Epimastigotas permeabilizados (na presença de succinato, ADP, oligomicina e CCCP). Análise estatística teste T de Student  $p < 0,05$  foi considerado significativo, representado por (\*)

Devido a síntese de ATP estar acoplada aos processos de redução do oxigênio, ao adicionarmos ADP como substrato torna-se possível determinar a capacidade máxima de utilização deste oxigênio. Portanto, a partir do consumo de O<sub>2</sub> nas células permeabilizadas, podemos calcular o acoplamento da fosforilação oxidativa com a síntese de ATP, denominada Controle Respiratório (CR) (Tabela 2). Para o isolado SAO, o valor obtido em meio A está de acordo com o publicado anteriormente por nosso grupo em Nakamura et al [16], onde os epimastigotas foram mantidos somente em meio LIT com 20µg/ml. Contudo, nota-se que o controle respiratório aumentou crescentemente nos meios B e C, respectivamente. Sugerindo que conforme a concentração de hemina dos meios diminui, o controle respiratório do isolado tende a aumentar.

Controle respiratório de epimastigotas <i>T.cruzi</i>			
Isolado	Meio A	Meio B	Meio C
SAO	1,16 ± 0,15	1,14 ± 0,01	1,22 ± 0,08

Tabela 2: Controle respiratório dos epimastigotas *T. cruzi* SAO em meios de cultura com diferentes concentrações de hemina.

## CONCLUSÕES:

Os epimastigotas da cepa Y estão mantidos em cultura laboratorial há muito tempo, se adaptando ao meio LIT (A) e apresentando um maior índice de proliferação (IP) na concentração de 20µg/ml. Ao pré-adaptá-los em meio C, o IP foi reduzido nas três diferentes concentrações, sugerindo que esta cepa possivelmente é mais dependente de hemina. Entretanto, os isolados obtidos de pacientes portadores da DC apresentaram um perfil diferenciado de proliferação quando cultivados nas duas condições, frequentemente aumentando o IP após a pré-adoptação em meio C. O comportamento dos isolados também foi diferenciado em relação às prevalências morfológicas, concentração intracelular de hemina, produção de NADPH oriunda da via das pentoses fosfato, consumo de oxigênio e controle respiratório. Ainda que genotipados como TcII, tais 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 menos tóxica para o tratamento da DC.

## BIBLIOGRAFIA

1. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) . Acesso em 13 de jul 2024
2. DIAS, et al 2011. **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do trypanosoma cruzi no Brasil.** <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822011000800011>.
3. A GRACASOUZA, et al 2006. **Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.009>.
4. LOMBARDO, et al 2003. **5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00033-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00033-5).
5. TRIPODI, et al 2011. **Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways.** <http://dx.doi.org/10.4061/2011/873230>.
6. KOŔENÝ, et al 2013. **Make It, Take It, or Leave It: heme metabolism of parasites.** <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003088>.
7. PAES, et al 2020. **Gene expression profiling of *Trypanosoma cruzi* in the presence of heme points to glycosomal metabolic adaptation of epimastigotes inside the vector.** <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007945>.
8. ROSA, et al 2022. **Antileishmanial activity and insights into the mechanisms of action of symmetric Au(I) benzyl and aryl-N-heterocyclic carbenes.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111726>.
9. Miguel et al, 2013. **Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence.** doi: 10.1128/IAI.00687-13
10. MIELNICZKI-PEREIRA et al 2007. ***Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.12.001>.
11. SILVA, et al 2011. **O<sub>2</sub> consumption rates along the growth curve: new insights into trypanosoma cruzi mitochondrial respiratory chain.** <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-011-9369-0>.
12. Lara et al, 2007. **Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.238>
13. A MARTÍNEZ-DÍAZ, et al 2001. **Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains.** <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762001000100006>.
14. PAES, et al 2011. **The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*.** <http://dx.doi.org/10.1155/2011/174614>.
15. Piacenza et al 2009. **Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection.** <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.011>.
16. 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.
17. VIEIRA, et al 2023. **Glucose metabolism sustains heme-induced *Trypanosoma cruzi* epimastigote growth in vitro.** <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0011725>.