

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

GABRIELA SILVA FUGA, FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC). A estimativa é que no mundo, haja 7 milhões de indivíduos infectados [1]. O tratamento não é considerado ideal, uma vez que o benznidazol não se mostra eficaz na fase crônica da doença e está associado a efeitos colaterais graves, os quais frequentemente dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento [2]. 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. Nesse contexto, o estudo dos mecanismos de defesa antioxidante do parasita é de suma importância, considerando a busca por alvos para o desenvolvimento de fármacos mais específicos e, conseqüentemente, menos tóxicos para os pacientes.

OBJETIVOS:

Estabelecer um estudo comparativo entre oito isolados obtidos de pacientes portadores de diferentes formas da DC e entre uma cepa de referência Y, também da DTU TcII, com relação aos seguintes parâmetros: (1) Produção de superóxido e de H₂O₂, (2) Determinar a EC₅₀ para o H₂O₂ e (3) a produção de NADPH pela via das pentoses.

METODOLOGIA:

Cultura de *T. cruzi* (epimastigotas): *T. cruzi* epimastigotas (5,2 x 10⁶/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 monitorada 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 absorvância 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].

Ensaio de viabilidade celular para o H₂O₂: 5×10^6 células foram lavadas em PBS, contadas por câmara de Neubauer e incubadas com diferentes concentrações de H₂O₂ durante 30 minutos a 28°C. Após o período, as células foram ressuspensas em meio LIT completo para 24h depois adicionar o MTT (5mg/mL) por 3 horas. Por fim, o SDS 20% foi adicionado por 30 minutos para ler a absorvância em dois comprimentos de onda de 600nm e 650nm [6].

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Estudo prévio do nosso grupo [7], 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 [7]. O *T. cruzi* invade primeiramente os macrófagos do hospedeiro resultando em uma liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como tentativa de eliminar o parasita [8]. No entanto, o *T. cruzi* possui defesas antioxidantes formadas por diversas enzimas e moléculas que possuem atividade de oxirredução [9-10].

Dessa maneira, foi determinada a resistência dos isolados frente ao estresse oxidativo utilizando a técnica do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) [6] para assim determinamos a EC₅₀ para o H₂O₂, uma das EROs liberada pelo macrófago que o parasita consegue neutralizar. Os resultados estão elucidados na **Tabela 1**.

Pode-se observar uma considerável diversidade na resistência entre os isolados e a cepa estudada. Em particular, o isolado MJFL exibiu a menor resistência, com um valor de $72,4 \pm 7,2 \mu$ M. Em contrapartida, outros isolados, como SAO, MAB e MHBL, demonstraram uma resistência significativamente maior, todos apresentando valores superiores a 200 μ M de H₂O₂. Esses dados indicam uma variação na capacidade de resistência ao peróxido de hidrogênio entre os diferentes isolados analisados, sugerindo potenciais diferenças em suas respostas adaptativas ou mecanismos de defesa.

Tabela 1: Viabilidade celular dos isolados e cepa de *T. cruzi* para para o H₂O₂.

Isolado	Y	AP	MJFL	MFS	MHBL	MAMA	SAO	MAB
EC ₅₀								
H ₂ O ₂ (μM)	103,0 ± 15,4	109,4	72,4 ± 7,2	134,8 ± 1,1	211,8 ± 2,8	116,3 ± 20,9	219,7	252,9 ± 10,9

5.10⁶ células de *T. cruzi* epimastigotas em fase estacionária inicial foram incubados em PBS na presença de concentrações crescentes de H₂O₂ (0-300μM) e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT [6].

O sistema de defesa do *T. cruzi* contra EROs é bastante complexo, no entanto suas vias convergem para uma enzima chamada tripanotona redutase, que utiliza o NADPH como doador de elétrons [8]. Sendo assim, a produção de NADPH pela via das glicoses fosfatos é essencial para manter o sistema de defesa do *T. cruzi*. Dessa maneira, foi realizado o estudo da produção de NADPH pela via das glicoses fosfatos. Conforme observado na **Figura 1**, o isolado MJFL apresenta uma produção de NADPH extremamente baixa, o que coincide com sua menor resistência ao H₂O₂, registrada em 72,4 ± 7,2 μM. Esses dados sugerem a importância do NADPH no sistema de neutralização do peróxido de hidrogênio. Em contraste, o isolado SAO demonstrou a maior produção de NADPH, o que possivelmente está correlacionado com sua elevada resistência ao H₂O₂ (219,7 μM). Em um estudo comparativo entre a cepa Y, modelo deste estudo, e a Tulahuen 2 observou-se também resistências diferentes ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ [5] (EC₅₀ para o H₂O₂ de 98.5 ± 1.7 μM e 133.1 ± 2.1 μM respectivamente). Quando analisada a atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase, a primeira enzima envolvida na produção de NADPH pela via das pentoses fosfato, observou-se que a Tulahuen 2 possui maior produção, além de maior taxa de proliferação e menor susceptibilidade ao H₂O₂ [4]. Esses dados podem indicar uma relação significativa entre os níveis de NADPH e a capacidade de resistência ao peróxido de hidrogênio, destacando o papel na resposta dos isolados frente estresse oxidativo. Além disso, corroboram com os resultados aqui obtidos, reforçando a heterogeneidade da população de *T. cruzi* quanto ao estresse oxidativo, como reportado para outras cepas.

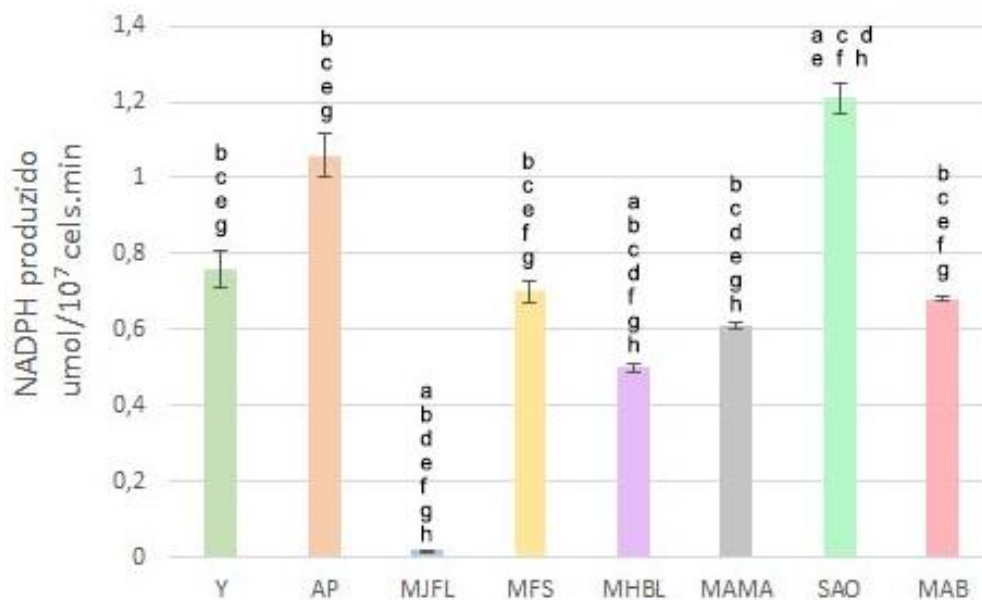


Figura 1: Produção de NADPH produzido pelos isolados de *T. cruzi*. A produção foi determinada pela dosagem enzimática das enzimas produtoras de NADPH da via das pentoses fosfato. Os dados significativos estão representados no gráfico, onde Y (a), AP (b), MJFL (c), MFS (d), MHBL (e), MAMA (f), SAO (g) e MAB (h). Análise estatística pelo teste *t* de Student.: *p* < 0.05 considerado significativo, para os grupos.

Além disso, foi analisada a produção basal de H₂O₂ nos isolados, tanto na ausência quanto na presença de Antimicina A (AA), um inibidor do Complexo III da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Para verificamos o aumento desta produção em todas as células devido ao aumento do vazamento de elétrons pela CRM. A **Figura 2** ilustra que tanto os isolados quanto a cepa exibiram comportamentos similares quando submetidos à adição de AA, resultando em um aumento na produção de H₂O₂. Observou-se que o isolado MJFL, em particular, apresentou um aumento significativo na produção de H₂O₂ com AA. Esse comportamento pode estar relacionado à sua baixa produção de NADPH, sugerindo que a capacidade limitada de produção deste composto poderia comprometer a eficiência dos mecanismos antioxidantes do isolado MJFL. Além disso a baixa resistência ao H₂O₂ (EC₅₀ = 72,4 +/- 7,2 µM) levanta a hipótese dele ter menor expressão das enzimas antioxidantes como a triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPx), assim como para parasitas da cepa Y [5], por isso sua produção de H₂O₂ na **Figura 2** é maior que os demais isolados. Por outro lado, o isolado MJFL apresentou a maior resistência ao benznidazol [7] entre todos os isolados estudados, confirmando que cada isolado possui características únicas. A resistência ao benznidazol não está associada à produção de H₂O₂, mas sim à produção de glioxal pelas nitroreduases do parasita [7]. Além disso, também é possível observar que o isolado AP foi o que apresentou menores níveis de H₂O₂. Esse isolado possui uma EC₅₀ semelhante à cepa Y (109,4 e 103,0 ± 15,4 respectivamente), no entanto o AP produziu menores quantidades de H₂O₂ (**Figura 2**) podendo estar relacionado à altas taxas de NADPH (**Figura 1**) que atua no sistema de defesa, especialmente na neutralização do H₂O₂.

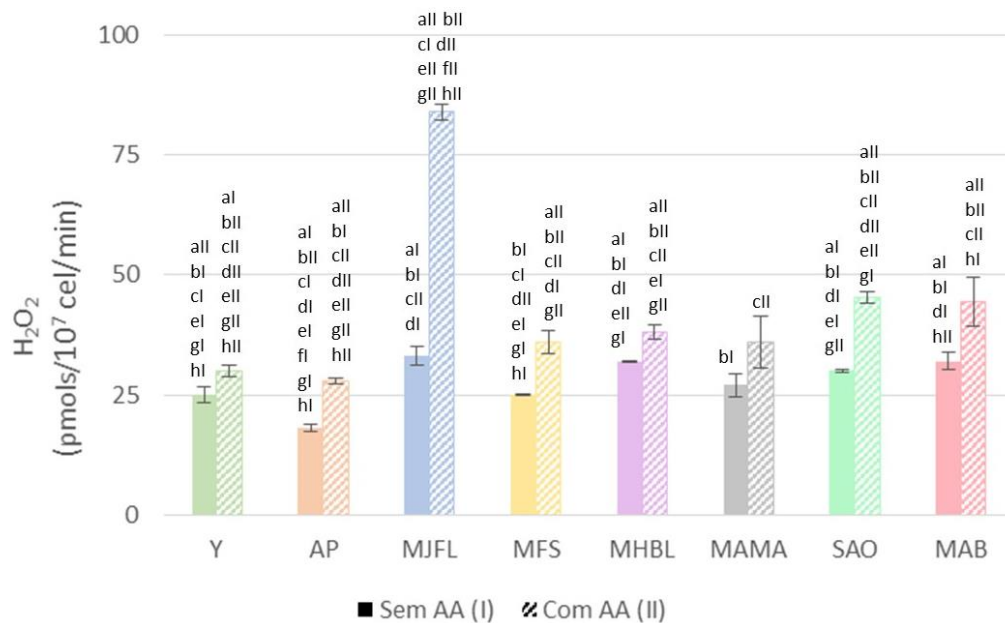


Figura 2: Produção de peróxido de hidrogênio por *T. cruzi* epimastigotas. A produção de H₂O₂ foi determinada em 10⁷ céls/ml na ausência (barras cheias) e presença (barras listradas) de AA (1 µg/mL) pela técnica do Amplex red®. Os dados significativos estão representados no gráfico por grupo controle (I) e grupo com AA (II), onde Y (a), AP (b), MJFL (c), MFS (d), MHBL (e), MAMA (f), SAO (g) e MAB (h). Análise estatística pelo teste *t* de Student.: $p < 0.05$ considerado significativo, para os grupos.

Por fim, foi estudado a produção de superóxido mitocondrial (**Figura 3**), visto que o sistema antioxidante do parasita possui enzimas capazes de neutralizar esse composto através da superóxido dismutase B. Observa-se que o MJFL possui produção baixa podendo estar relacionado a níveis maiores da expressão da enzima. Mas a produção de superóxido não é o único fator para determinar a expressão dessa enzima. Em [4] na fase *log* a expressão da SOD B foi parecida entre as cepas Y e Tulahuen 2, mas a SOD A da Y foi maior, mesmo tendo produção de superóxido semelhantes. Este fato justifica-se pelos parasitas da cepa Y na fase *log* apresentarem um menor consumo de oxigênio aumentando assim o escape de elétrons e os níveis de superóxido [4]. O consumo de oxigênio dos isolados foi estudado e observou-se que o isolado MAB possui baixo consumo de oxigênio [7], aumentando assim o escape de elétrons e os níveis de superóxido, o que pode ser analisado através da **Figura 3**. O interessante foi que

o isolado MAB comportou-se de maneira contrária aos demais isolados e cepa quando adicionado AA, onde diminuiu a produção de superóxido.

Os resultados obtidos indicam que assim como os dados de bioenergética mitocondrial, ainda que pertencentes à mesma DTU TcII, é possível observar que há diferenças na produção de espécies reativas de oxigênio e resistência entre os isolados e cepa que foram estudados. Sugerindo assim, que dentro do grupo TcII pode-se ter uma variação inter-grupo [7].

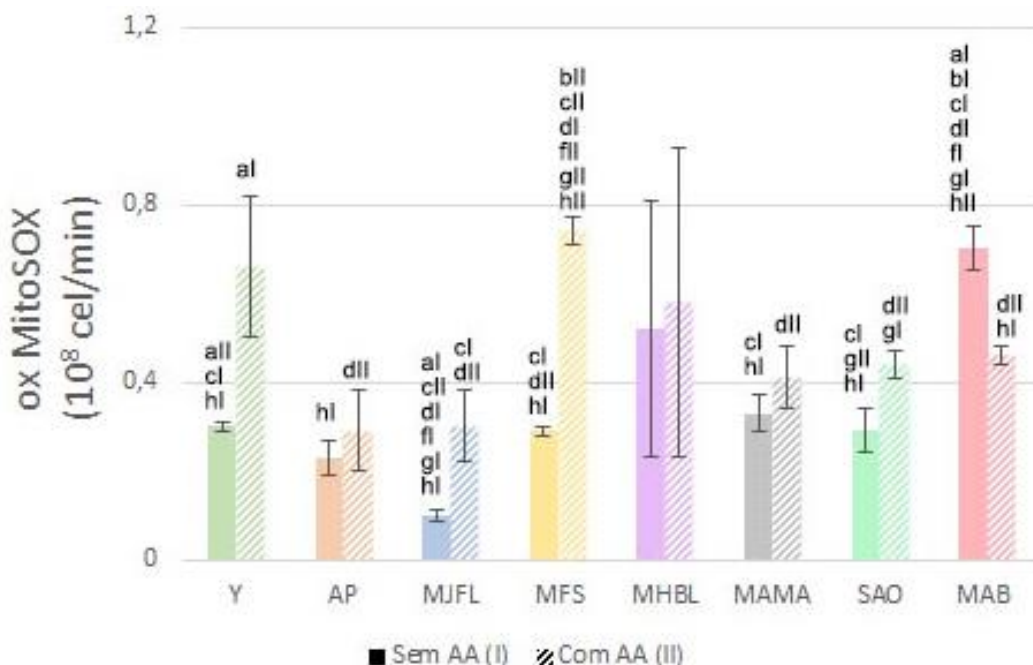


Figura 3: Produção de superóxido por *T. cruzi* epimastigotas. 3.10^8 cels/mL previamente carregados com MitoSOX[®], foram incubadas em PBS e a fluorescência do oxMitoSOX foi determinada em um fluorímetro. Grupos na ausência (barras cheias) e presença (barras listradas) de antimicina A (1 μ g/mL). Os dados significativos estão representados no gráfico por grupo controle (I) e grupo com AA (II), onde Y (a), AP (b), MJFL (c), MFS (d), MHBL (e), MAMA (f), SAO (g) e MAB (h). Análise estatística pelo teste *t* de Student.: $p < 0.05$ considerado significativo, para os grupos.

REFERÊNCIAS:

- [1] Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2024. Ministério da Saúde. volume 55. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-08.pdf>> Acesso em: 28 Jul. 2024
- [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: 28 Jul. 2024
- [3] Castalani 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] Zauli-Nascimento R et al, 2010 Trop Med Int Health 15(1):68-76. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02414.x.
- [7] Nakamura et al, 2022 Curr Res Microb Sci 3:100110. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100110. eCollection 2022
- [8] Kierszenbaum, F et al;. The Journal of Immunology. 1974. v. 112, n. 5, p. 1839–44.
- [9]Freire, A.C.G. 2016. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-BCELK2/1/tese_anna_claudia_guimaraes_freire_08925762609.pdf> Acesso em: 30 Jul 2024
- [10] Piacenza, L et al. Antioxidants & Redox Signaling, 2012. v. 19, n. 7, p. 723-34.